

Série A. N° 2199.
N° d'ordre 1330.

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Jean CHAZE

Assistant à la Faculté des Sciences de Paris.

1^{re} THÈSE. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE BIOLOGIQUE DES ALCA-
LOÏDES DU TABAC.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 1931 devant la Commission d'examen.

M. A. GUILLIERMOND..... *Président.*

M. A. DEREIMS ... }
M. G. BOHN } *Examineurs.*

16 NOV 1931

PARIS

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN (VI^e)

1932

Série A. N° 2199.
N° d'ordre 1330.

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Jean CHAZE

Assistant à la Faculté des Sciences de Paris.

1^{re} THÈSE. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE BIOLOGIQUE DES ALCA-
LOÏDES DU TABAC.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 1931 devant la Commission d'examen.

M. A. GUILLIERMOND..... *Président.*

M. A. DEREIMS ... }
M. G. BOHN } *Examineurs.*

PARIS

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN (VI^e)

1931

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen..... C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du globe.
Doyen honoraire..... M. MOLLIARD.

Professeurs honoraires. { H. LE CHATELIER.
 H. LEBESQUE.
 A. FERNBACH.
 A. LEDUC.
 E. HÉROUARD.

ÉMILE PICARD..... Analyse supérieure et algèbre supérieure.
 E. GOURSAT..... Calcul différentiel et calcul intégral.
 G. KÖNIGS..... Mécanique physique et expérimentale.
 P. JANET..... Électrotechnique générale.
 F. WALLERANT..... Minéralogie.
 P. PAINLEVÉ..... Mécanique analytique et mécanique céleste.
 M. CAULLERY..... Zoologie (Évolution des êtres organisés).
 Émile BOREL..... Calcul des probabilités et Pysique mathém.
 H. ABRAHAM..... Physique.
 M. MOLLIARD..... Physiologie végétale.
 E. CARTAN..... Géométrie supérieure.
 Gabriel BERTRAND..... Chimie biologique.
 Jean PERRIN..... Chimie physique.
 L. LAPICQUE..... Physiologie générale.
 Mme P. CURIE..... Physique générale et radioactivité.
 G. URBAIN..... Chimie générale.
 L. MARCHIS..... Aviation.
 E. VESSIOT..... Théorie des fonctions et théorie des trans-

formations.

A. COTTON..... Physique générale.
 J. DRACH..... Application de l'analyse à la géométrie.
 Charles FABRY..... Physique.
 R. LESPIEAU..... Théories chimiques.
 P. PORTIER..... Physiologie comparée.
 Charles PÉREZ..... Zoologie.
 É. BLAISE..... Chimie organique.
 P.-A. DANGEARD..... Botanique.
 Rémy PERRIER..... Zoologie (Enseignement P. C. N.).
 Léon BERTRAND..... Géologie structurale et géologie appliquée.
 E. RABAUD..... Biologie expérimentale.
 G. JULIA..... Mathématiques générales.
 Paul MONTEL..... Mécanique rationnelle.
 V. AUGER..... Chimie appliquée.
 P. WINTREBERT..... Anatomie et histologie comparées.
 O. DUBOSCQ..... Biologie maritime.
 Eugène BLOCH..... Physique théorique et physique céleste.
 A. MAILHE..... Étude des combustibles.
 L. LUTAUD..... Géographie physique et géologie dynamique.
 Henri VILLAT..... Mécanique des fluides et applications.
 Ch. JACOB..... Géologie.
 P. PASCAL..... Chimie minérale.
 Léon BRILLOUIN..... Théories physiques.
 E. ESCLANGON..... Astronomie.
 H. BÉNARD..... Mécanique expérimentale des fluides.
 MAUGUIN..... Minéralogie.
 L. BLARINGHEM..... Botanique.
 A. GUILLIERMOND..... Botanique (P. C. N.).
 A. DUFOUR..... Physique (P. C. N.).

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

E. PÉCHARD..... Chimie (Enseig^t P. C. N.).
 A. GUILLET..... Physique.
 M. GUICHARD..... Chimie minérale.
 A. MICHEL-LÉVY..... Pétrographie.
 A. DEREIMS..... Géologie.
 A. DENJOY..... Calcul différ. et intégr.
 H. MOUTON..... Chimie physique.
 L. DUNOYER..... Optique appliquée.
 M. JAVILLIER..... Chimie biologique.
 ROBERT-LÉVY..... Zoologie.
 A. DEBIERNE..... Radioactivité.
 E. DARMOIS..... Physique.
 G. BRUHAT..... Physique.
 F. PICARD..... Zoologie (Évolution des êtres organisés).
 L. JOLEAUD..... Paléontologie.

M. FRÉCHET..... Calcul des Probabilités et phys. math.
 Mme RAMART-LUCAS..... Chimie organique.
 BÉGHIN..... Mécanique théorique des fluides.
 FOCH..... Mécanique expérimentale des fluides.
 PAUTHENIER..... Physique (P. C. N.).
 VILLEY..... Mécanique physique et expérimentale.
 DE BROGLIE..... Théories physiques.
 LABROUSTE..... Physique du Globe.
 FREUNDLER..... Chimie (P. C. N.).
 PRENANT..... Zoologie.
 P. JOB..... Chimie générale.
 CHRÉTIEN..... Optique appliquée.

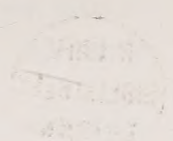
Secrétaire..... A. PACAUD.

A

LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

* * *

A TOUS LES MIENS



A NOTRE MAITRE
M. A. GUILLIERMOND
PROFESSEUR DE BOTANIQUE A LA SORBONNE
AVEC
L'HOMMAGE DE NOTRE RECONNAISSANCE
ET
DE NOTRE RESPECTUEUX ATTACHEMENT

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE BIOLOGIQUE DES ALCALOÏDES DU TABAC

Par JEAN CHAZE

ASSISTANT A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

INTRODUCTION

Aucune espèce de Tabac n'étant originaire du vieux continent, c'est à la fin du ^{xvi}e siècle, au moment de la découverte de l'Amérique, que l'on peut faire remonter la découverte de la plante qui devait jouer un rôle si important à tant d'égards.

La première plantation de Tabac fut faite en 1556, sous la direction du moine THEVET; mais ce fut l'ambassadeur français Jean NICOT qui en fit la renommée en l'introduisant à la cour royale (1559); le Tabac n'était alors connu que pour ses propriétés médicinales; on l'appelait: « L'herbe sainte, sacrée, divine. »

Le nom de *Nicotiana* lui fut donné par le duc de Guise nom consacré par l'autorité scientifique du botaniste français DALECHAMP (1586); c'est sous ce nom qu'il figure dans le *Genera plantarum* de LINNÉ et sous lequel les Tabacs continuent à être désignés dans le monde botanique.

Le principe immédiat le plus remarquable des Tabacs étant la nicotine, c'est à sa connaissance que devait d'abord se porter la sagacité des chercheurs.

Dès 1667, BAILLARD dit que « l'extrait des feuilles de Tabac pouvait tuer les animaux ». En 1752, Domenico BROGIANI parle de l'*oleum tabaci*, auquel à son tour il reconnaît des propriétés toxiques. En 1809, le Dr Gaspard CERIOLI, de

Crémone, publie dans le *Giornale bibliografico italiano* un mémoire sur l'analyse chimique du Tabac, contenant, entre autres produits, une huile volatile qui en constitue toute la vertu.

Mais le premier document précis nous est apporté la même année par VAUQUELIN, qui extrait de *Nicotiana tabacum* et de *Nicotiana angustifolia* « un principe âcre et volatil, soluble dans l'eau et dans l'alcool, différent de ceux déjà connus et donnant au Tabac le caractère particulier qui le fait distinguer de toute autre préparation végétale ».

En 1828, POSELT et REINMANN retrouvent le même principe, qu'ils nomment nicotine et qu'ils décrivent ainsi : « C'est une base alcaline, contenant une quantité d'azote considérable et qui doit être regardée comme un des poisons les plus actifs. » Les premières analyses sont faites sur des feuilles desséchées et fermentées. Par la suite, les deux chimistes retrouvent le même principe dans les feuilles fraîches (1).

La recherche microchimique des alcaloïdes commence vers la même époque que la découverte de VAUQUELIN, mais tous ces travaux ne sont que des ébauches imparfaites, car les auteurs se contentent de citer les organes d'où les principes actifs sont extraits ; le premier est celui de KIELMEYER et KÆSTLIN (1808) sur diverses plantes possédant la « vertu narcotique ». En 1876, Joannès CHATIN fait paraître une thèse sur le siège des principes actifs des plantes médicinales.

La première recherche de microchimie par les méthodes de localisation est due au Russe BORSCHOW (1884), qui s'occupe de la vératrine ; en 1884, ce sont celles de ROSSOLL et LINDT sur la strychnine.

Mais c'est à Leo ERRERA (1887) que nous devons la connaissance la plus complète de la microchimie des alcaloïdes ; si sa conception sur le rôle biologique des alcaloïdes est aujourd'hui abandonnée, il n'en a pas moins créé une méthode qui n'a subi depuis lors que peu de modifications, et ses travaux ont suscité de la part de ses nombreux élèves toute

(1) Pour toutes les questions concernant l'histoire, la géographie, la culture, la statistique du Tabac, nous renvoyons le lecteur soit au livre du Dr O. COMES (Naples, 1900), ou mieux encore à l'ouvrage plus récent et si bien documenté de CAPUS, LEULLIOT et FOEX.

une série de recherches, qui restent encore des modèles.

C'est dans le premier mémoire d'ERRERA, publié en collaboration de CLAUTRIAU et MAISTRIAU, que nous trouvons la localisation de la nicotine dans le *Nicotiana macrophylla*, reprise ensuite par MOLLE dans le *Nicotiana tabacum*. Par la suite, un grand nombre d'auteurs s'occupent du même sujet ; nous exposerons leurs résultats au cours de notre mémoire.

Tous les travaux sur la localisation histologique des alcaloïdes ont été poursuivis au moyen de techniques brutales, défigurant ou même détruisant le protoplasma ; ils ont permis de reconnaître les cellules dans lesquelles existent les alcaloïdes, mais n'ont apporté aucun renseignement précis quant aux relations pouvant exister entre ces corps et les divers constituants figurés du cytoplasma.

Il nous est apparu qu'il serait intéressant de combler cette lacune, en étudiant la genèse et la localisation des alcaloïdes à l'aide des techniques et des méthodes de la cytologie moderne, méthodes si propres à donner une exacte notion de la morphologie cellulaire ; puis en recherchant le devenir de ces substances (1).

Ce mémoire est l'exposé des résultats auxquels nous a conduit cette étude.

Notre travail comprendra les parties suivantes :

Dans un premier chapitre, nous exposerons nos techniques. Dans le deuxième chapitre, nous localiserons la nicotine dans l'ensemble de la plante à divers stades de son développement. Le lieu de formation de la nicotine à l'intérieur de la cellule sera étudié dans un troisième chapitre. La quatrième partie aura pour objet le comportement spécial de la nicotine au niveau des épidermes. Nous terminerons enfin (cinquième chapitre) par les considérations générales, et nous tirerons les conclusions de nos recherches.

*
* *

Nous tenons à nous acquitter ici du très agréable devoir

(1) Nos examens ont porté exclusivement sur la variété Paraguay de *Nicotiana tabacum*, qui est la variété la plus couramment cultivée en France.

de remercier ceux de nos Maîtres ou amis qui nous ont aidé.

C'est d'abord à M. A. GUILLIERMOND, Professeur de Botanique à la Sorbonne, que va notre profonde gratitude. Entraîné par son activité communicative, nous avons largement appliqué, dans un nouveau domaine, les méthodes cytologiques si fécondes dont il fut le principal promoteur, et notamment les techniques de coloration vitale qui nous furent si précieuses.

M. le professeur MOLLIARD, Membre de l'Institut, a bien voulu s'intéresser à nos recherches. Sa bienveillance et ses conseils ont été pour nous un incomparable encouragement.

Nous tenons à présenter nos respectueux remerciements à M. le professeur COSTANTIN, Membre de l'Institut, qui a bien voulu permettre la publication de ce mémoire dans les *Annales des Sciences naturelles*.

M. DUBRISAY, Ingénieur en chef des Tabacs, Directeur de l'École d'application des Manufactures de l'État, persuadé de l'utilité des recherches de science pure en vue d'applications pratiques possibles, a été l'initiateur de ce travail ; il l'a constamment encouragé de la manière la plus utile, notamment en nous faisant accorder les autorisations nécessaires pour travailler dans les champs d'expérience de l'Administration des Tabacs. Nous lui exprimons nos respectueux remerciements.

M. BONNET-DAUPHINÉ, Directeur-adjoint à l'École des Hautes-Études, nous a permis de profiter largement des ressources de son laboratoire et a suivi nos travaux avec le plus vif intérêt. Nous le prions d'agréer ici l'expression de notre affectueuse reconnaissance.

La compétence de M. MANGENOT, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences de Rennes, dans toutes les questions biologiques, fut souvent utilisée par nous. Ses conseils, ses justes critiques nous furent toujours prodigués ; nous ne saurions trop lui dire combien demeurent profondes notre affectueuse amitié et notre reconnaissance.

Nous tenons encore à exprimer notre gratitude à M. FOEX, dont l'appui matériel ne nous fit jamais défaut ; à nos amis MM. EICHORN, DAVY DE VIRVILLE, BOUVRAIN, qui, de différentes manières, nous ont rendu service.

Nous nous reprocherions de ne pas remercier M. GAVALLET, auquel nous devons les microphotographies reproduites dans ce mémoire, et ce maître en soufflage de verre qu'est M. ANACRÉON.

Enfin, nous remercions le Conseil d'Administration de la Caisse des Recherches scientifiques et l'Administration des Tabacs, en la personne de son Directeur général M. BLONDEAU, pour les subventions qu'ils ont bien voulu nous accorder.

CHAPITRE PREMIER

TECHNIQUES

A. — Détection microchimique des alcaloïdes.

En principe, les substances chimiques nécessaires à la détection microchimique des alcaloïdes sont les mêmes que celles qui agissent *in vitro* sur ces corps.

Le réactif le plus spécifique de la nicotine, celui qui est le plus employé par les chimistes, est la solution d'acide silico-tungstique préconisée en 1899 par Gabriel BERTRAND. La réaction est d'une extrême sensibilité, puisqu'elle permet, d'après cet auteur, de déceler la nicotine en solution à 1/20 000. En 1909, Gabriel BERTRAND et JAVILLIER signalent que l'on peut pousser la sensibilité de la réaction au delà de cette limite. Dans 10 centimètres cubes d'une solution renfermant 1/200 000 de nicotine à l'état de tartrate, on obtient un louche avec 11 gouttes de la solution ; cette sensibilité peut être poussée au 1/300 000 dans un milieu acidifié au 1/1 000.

Nous avons essayé d'utiliser l'acide silico-tungstique à la recherche des alcaloïdes dans les cellules, mais les résultats que nous avons obtenus n'ont pas été assez satisfaisants pour nous permettre d'employer couramment ce réactif en effet, les précipités blanchâtres de silico-tungstate de nicotine sont peu visibles au microscope et sont toujours d'une interprétation difficile.

Aussi nous avons eu recours à des réactifs moins spécifiques, mais d'un usage plus commode, et parmi ceux-ci nous avons choisi la solution d'iodure de potassium iodé dit réactif de BOUCHARDAT ou de WAGNER-KIPPERBENDER. Les formules que l'on a préconisées pour sa préparation sont très différentes ; la teneur en iode pouvant varier de 1 à 5 grammes,

nous avons utilisé la formule suivante, qui nous a donné d'excellents résultats :

$$\begin{aligned} \text{I} &= 1 \text{ gramme.} \\ \text{IK} &= 1 \text{ —} \\ \text{H}^2\text{O distillée} &= 100 \text{ grammes.} \end{aligned}$$

Cette solution devra être renouvelée souvent, car elle ne tarde pas à s'altérer.

CLAUTRIAU conseille d'y ajouter un peu de carbonate d'ammonium ; le réactif donnerait ainsi une coloration légèrement différente aux alcaloïdes et aux matières protéiques ; les examens nombreux que nous avons faits en utilisant cette méthode ne nous permettent pas de confirmer cette opinion ; seule, une grande habitude permet cette distinction, qui reste d'ailleurs toujours subjective. Il existe des épreuves autrement concluantes, que nous citerons plus loin et qui constituent un critérium beaucoup plus sûr.

Le réactif de BOUCHARDAT pénètre aisément dans les cellules, mais avec une vitesse inégale suivant les organes. Les cellules de la racine sont les plus perméables ; c'est ensuite l'épiderme détaché qui se colore le plus facilement dans ce tissu ; les cellules stomatiques accusent d'abord la réaction ; les poils sont pénétrés plus lentement, et leurs cellules basales, plus riches en principe actif, sont les premières à réagir.

Dans la plantule étudiée en entier, l'axe hypocotylé et les cotylédons se colorent après la racine. Enfin, dans les coupes transversales, les précipités apparaissent à peu près simultanément dans toutes les cellules.

Le réactif de BOUCHARDAT donne avec les alcaloïdes des précipités pouvant présenter divers aspects ; ils sont généralement granuleux et de couleur brun-kermès, mais ils peuvent être, moins souvent, homogènes et de couleur brun noirâtre, présentant ou non des contours finement découpés.

Les autres réactifs desquels nous avons fait usage n'ont été que des réactifs témoins ; ce sont :

1^o L'iodure double de Hg et de K, ou réactif de MAYER, qui donne avec les alcaloïdes un précipité blanc jaunâtre ;

2° L'acide phosphomolybdique, qui donne une réaction analogue ;

3° Le bichlorure de Hg, qui fournit un précipité blanc ;

4° Le chlorure de Pt, qui provoque un précipité blanc jaunâtre ;

5° L'acide picrique en solution aqueuse à saturation, qui agit de même.

Comme on vient de le voir, les précipités obtenus avec ces divers réactifs sont de couleur peu prononcée ; il est donc parfois difficile de les interpréter. De plus, presque tous présentent le même inconvénient que le réactif de BOUCHARDAT, c'est-à-dire qu'ils sont peu spécifiques, sans offrir l'avantage si appréciable de ce dernier, d'une coloration nettement tranchée.

Mais, si les réactions de coloration n'offrent que des ressources limitées à cause de leur faible spécificité, les divers constituants cellulaires présentent entre eux des différences importantes résultant de leur inégale solubilité dans l'alcool ; d'un autre côté, les matières grasses, qui peuvent aussi se colorer avec le réactif iodo-ioduré, présentent des réactions propres qui permettent de les caractériser d'une façon certaine (réaction à l'acide osmique, au bleu d'indophénol naissant, etc.).

La différence entre les matières protéiques et les alcaloïdes est basée sur ce fait fondamental : les sels acides des alcaloïdes sont solubles dans l'alcool, tandis que les matières protéiques y sont presque toutes insolubles.

Cette propriété a d'abord été utilisée par STASS pour l'extraction et l'analyse macrochimique des alcaloïdes ; elle a été introduite et vulgarisée dans le domaine de la microchimie par ERRERA et ses élèves, et elle y a rendu d'importants services.

ERRERA conseille trois dissolvants des alcaloïdes, qui sont :

1° L'alcool absolu ;

2° L'alcool acidulé par l'acide chlorhydrique ;

3° L'alcool acidulé par l'acide tartrique.

Nous avons fait usage, dans nos recherches, de ce dernier dissolvant dans les proportions suivantes :

Acide tartrique cristallisé	1 gramme.
Alcool absolu	20 cent. cubes.

Voici la façon d'utiliser ce mélange afin d'établir la part des réactions à attribuer aux alcaloïdes et aux matières protéiques : Après avoir constaté que les réactifs généraux des alcaloïdes donnent une réaction positive sur les coupes faites dans une région déterminée ou dans des fragments de tissu ou d'organe, on procède à une série de coupes ou prélèvements semblables qui sont déposés dans l'alcool tartrique, où elles séjournent un temps variable entre trente minutes et deux heures (trente minutes est un temps suffisant pour les fragments d'épiderme et pour les plantules); on lave ensuite les objets dans de l'eau distillée, et on les traite par les mêmes réactifs généraux précédemment employés.

Si les réactions colorées obtenues dans la première série d'examen étaient provoquées par les alcaloïdes, ces réactions n'ont plus lieu après passage dans l'alcool tartrique, qui dissout le principe actif; si, au contraire, l'on obtient dans cette deuxième série d'examen une nouvelle coloration; celle-ci est due aux matières protéiques précipitées dans la cellule.

On voit l'importance d'une telle discrimination, qui nous a été particulièrement utile lors de nos recherches dans les tissus riches en matières protéiques, notamment dans les cellules de l'ovaire et de l'anthère, où une grande partie des réactions doit être attribuée aux albuminoïdes.

Mais l'on remarque que ces diverses techniques, qu'il est indispensable de connaître et de mettre en action, négligent complètement l'étude du cytoplasme et des produits qu'il renferme en dehors des alcaloïdes. Or, il nous est apparu absurde d'affirmer *a priori* que ces éléments ne jouent aucun rôle dans la production des alcaloïdes, leur genèse n'étant qu'un chaînon dans l'ensemble des phénomènes physico-chimiques qui ont lieu dans la cellule.

Les techniques que nous avons employées à cet effet se répartissent en deux groupes : les colorations vitales, les fixations et colorations des coupes fixées.

B. — Colorations vitales.

La coloration vitale des vacuoles présente un intérêt certain ; il est en effet le plus souvent admis, comme nous le verrons plus loin, que les vacuoles sont les lieux de formation des alcaloïdes, sans toutefois qu'aucune preuve ait été jusqu'à présent donnée de cette assertion.

La coloration vitale des vacuoles a été obtenue pour la première fois par PFEFFER (1886) ; mais, pendant longtemps, nos connaissances à ce sujet restèrent en suspens, parce que nous ne possédions pas une technique vitale permettant leur étude, surtout dans les tissus embryonnaires.

Le point de départ de nos connaissances actuelles est dû à GUILLIERMOND (1913), qui, en étudiant vitalement des jeunes folioles de Rosier, a constaté que le pigment anthocyannique apparaissait dans les cellules sous forme de fins éléments filamenteux, lesquels se gonflaient ensuite pendant la différenciation cellulaire et se transformaient en vacuoles. Ces dernières, par fusion, formaient ensuite une vacuole unique.

Depuis lors, les nombreux travaux de GUILLIERMOND, de P.-A. DANGEARD, de PARAT et de leurs collaborateurs, pour ne citer que les principaux auteurs, ont prouvé qu'il était possible de colorer vitalement les vacuoles dans les cellules des végétaux et des animaux, ce qui facilite grandement l'étude de ces éléments.

Mais il était aussi indispensable de savoir quelle était l'action de ces colorants vitaux sur la cellule, de connaître si leur emploi n'entraînait pas trop rapidement la mort du protoplasme, et si, d'autre part, les figures obtenues correspondaient bien toujours à des éléments existant réellement, et non à des altérations produites par les colorants eux-mêmes. Ces divers problèmes ont été élucidés par les travaux de GUILLIERMOND ; ce savant a établi tout récemment les principes de la coloration vitale des vacuoles, méthode que nous avons employée et qui nous a donné les plus heureux résultats.

Les principaux colorants vitaux des vacuoles sont : le rouge neutre et les bleus de crésyl, de toluidine, de méthyl-

lène et de Nil ; mais le colorant de choix est le rouge neutre, qui est le moins toxique ; ce colorant présente toutefois l'inconvénient de teinter certaines graisses neutres, mais, sauf dans ce cas qui ne peut donner lieu à aucune confusion, les colorants vitaux indiqués ci-dessus sont pratiquement spécifiques des vacuoles.

La solution de rouge neutre n'empêche nullement le développement des organismes végétaux. La preuve de ce fait remarquable a été apportée par GUILLIERMOND, qui a obtenu la croissance d'un *Saprolegnia* et même le développement complet de ce Champignon, depuis la germination des spores jusqu'à la germination des zoosporanges, sur milieu coloré par du rouge neutre. Ce savant a aussi prouvé que, entre 1 milligramme et 2 milligrammes p. 100 du colorant, le Champignon croît aussi bien que sur les cultures témoins sans colorant. Dans des conditions analogues, SKUPIENSKI a obtenu le développement complet d'un Myxomycète : le *Didymium nigripes*. D'autres auteurs (AUBEL, AUBERTIN, GENEVOIS) sont parvenus à cultiver des levures dans des milieux sucrés additionnés de rouge neutre ; ces levures produisent alors une fermentation normale.

Des expériences ont aussi été faites récemment sur l'action du rouge neutre, dans le développement des Végétaux supérieurs. C'est ainsi qu'EICHORN a pu faire développer des racines d'un bulbe d'*Allium Cepa* dans une solution de rouge neutre ; les racines se sont allongées et ont emmagasiné le colorant à l'intérieur de leurs vacuoles ; la présence de la solution n'a nullement empêché les phénomènes de caryocinèse, qui se sont accomplis d'une manière normale.

GUILLIERMOND, DUFRÉNOY et LABROUSSE, ayant soigneusement désinfecté des graines de Tabac, les ont fait germer sur des milieux synthétiques gélosés additionnés de rouge neutre à diverses concentrations ; ils ont ainsi obtenu des plantules aseptiques. La germination des graines a lieu sur des milieux contenant jusqu'à 2 centigrammes p. 100 de rouge neutre ; le développement des plantules est tout à fait normal pour une concentration de 3 milligrammes p. 100, mais il est ralenti pour les milieux renfermant plus de 5 milli-

grammes p. 100. L'observation des racines ainsi développées montre que le colorant s'est accumulé à l'intérieur des vacuoles des cellules méristématiques et dans les jeunes vaisseaux.

L'ensemble de ces recherches démontre bien que la coloration par le rouge neutre est strictement limitée aux vacuoles et ne provoque aucune altération du cytoplasme ; elles apportent aussi la preuve expérimentale de la faible toxicité du rouge neutre.

Dans nos travaux, nous avons fait usage d'une solution de rouge neutre à 0,05 p. 100 environ ; l'eau employée était l'eau de source, l'eau distillée ne convenant pas, en raison de l'acidité (pH de l'ordre de 6) qu'elle présente le plus souvent. La solution était préparée au moment de son emploi et en petite quantité.

Nous avons employé ce réactif dès le début de la germination. Dans les graines, nous avons au préalable procédé à des coupes à main levée. Les coupes étant impossibles dans les plantules, nous avons introduit celles-ci entre lame et lamelle, et l'observation a été faite après un léger écrasement, qui permet d'écarter les assises périphériques corticales des cellules méristématiques. Lorsque les objets étaient trop volumineux, les diverses parties de la plantule (racine, axe hypocotylé, cotylédons) ont été sectionnées et étudiées séparément.

Dans certains cas, où il est indispensable de procéder consécutivement à la coloration au rouge neutre et à une réaction à l'aide de l'I³K, nous avons employé la technique suivante : les objets ayant été observés dans la solution de rouge neutre, nous introduisons entre lame et lamelle, sans déplacer la préparation, un fragment de papier-filtre ou de papier buvard, qui absorbe la solution de rouge neutre. Simultanément, du côté opposé de la préparation, nous déposons, à l'aide d'une pipette effilée, quelques gouttes de la solution de BOUCHARDAT, qui ne tarde pas à prendre la place de la solution de rouge neutre et à donner une coloration additionnelle des vacuoles.

Pour l'examen de l'épiderme de la feuille, ce tissu est détaché à l'aide du rasoir et des pinces ; il se présente alors

sous la forme d'une fine pellicule transparente, dans laquelle nous obtenons les colorations dans tous les éléments et dans les poils.

Il a été également fait usage de la coloration vitale, dans les cellules du bourgeon. Nous avons été alors conduit à procéder au préalable à des coupes au rasoir, qui doivent être assez épaisses, pour conserver l'intégrité de certaines cellules au moins.

Dans les organes floraux, on peut opérer soit par écrasement dans le bourgeon peu développé, soit à des coupes dans les organes adultes.

Nous ferons connaître plus loin le résultat de ces divers examens.

C. — Fixations et colorations.

Par l'emploi de ces techniques, nous nous sommes efforcés de mettre en évidence le cytoplasme et les enclaves qui y sont contenues, en particulier les mitochondries, et aussi éventuellement de fixer l'alcaloïde au lieu de sa formation, afin de voir s'il n'existerait pas une relation entre la présence des mitochondries et la production de l'alcaloïde.

Les plantules et les jeunes bourgeons floraux ont été introduits entiers dans les liquides fixateurs ; les tiges, feuilles et racines adultes ont été fragmentées en petits morceaux ayant au maximum 1 centimètre de longueur suivant leur plus grand diamètre.

Tous les fixateurs ne peuvent s'appliquer avec le même succès suivant les éléments que l'on désire mettre en évidence ; voici ceux que nous avons employés :

1^o La *solution d'acide picrique*, qui est un des réactifs des alcaloïdes que nous avons déjà signalés, et entre dans la composition de certains réactifs généraux. Les objets étaient immergés dans une solution aqueuse saturée d'acide picrique.

2^o Le *fixateur de BOUIN*. — Nous avons choisi ce fixateur, quoique ne conservant que très mal l'architecture cytoplasmique à cause de la présence d'acide picrique ; il est ainsi composé :

Acide picrique, solution aqueuse saturée	75 cent. cubes.
Formol du commerce (à 40 p. 100)	20 — —
Acide acétique cristallisé	5 — —

3° *Fixateur de REGAUD*. — Ce fixateur est le plus couramment employé pour mettre en évidence le chondriome ; on le prépare de la façon suivante :

Solution aqueuse de bichromate de K à 3 p. 100	80 parties.
Formol du commerce (à 40 p. 100)	20 —

La fixation est suivie d'une postchromisation, obtenue en laissant séjourner les objets pendant dix jours environ dans une solution de bichromate de K à 3 p. 100.

4° *Fixateur de MEVES*. — Le fixateur de MEVES permet l'étude du chondriome, bien que, pour celui-ci, le fixateur de REGAUD soit préférable. Voici la composition du fixateur de MEVES :

Acide chromique (sol. à 1 p. 100)	15 parties.
Acide osmique (sol. à 2 p. 100)	4 —

Après fixation par une des méthodes sus-indiquées, l'on procède au lavage à l'eau, puis au passage dans les alcools de concentration croissante, enfin à l'inclusion dans la paraffine, suivant les méthodes longuement décrites dans tous les traités de technique microscopique.

Les objets inclus sont ensuite coupés et disposés sur la lame, où ils sont collés ; et l'on procède aux colorations, qui permettront de mettre en évidence avec plus de netteté les constituants cellulaires. A cet effet, nous avons employé les colorations suivantes :

1° *Coloration à l'hématoxyline ferrique*. — Les coupes sont au préalable plongées pendant vingt-quatre heures dans une solution d'alun de fer ammoniacal (à 4 p. 100 dans l'eau distillée) ; elles sont ensuite traitées par l'hématoxyline de HEIDENHAIN, modifiée par REGAUD, c'est-à-dire qu'elles

sont colorées, pendant vingt-quatre heures, dans le liquide suivant :

H ² O distillée	80 cent. cubes.
Alcool à 95°	10 — —
Glycérine	10 — —
Hématoxyline	1 gramme.

On décolore ensuite (différenciation) dans un bain d'alun de fer à 4 p. 100 ; cette opération doit être suivie au microscope ; on l'arrête dès que les constituants cellulaires sont convenablement colorés.

Le chondriome est alors teint en noir et le cytoplasme en grisâtre ; pour mettre ce dernier plus nettement en évidence, on traite les coupes pendant quelques instants dans une solution aqueuse d'éosine ou d'érythrosine ; le cytoplasme prend alors une coloration rose, et les vacuoles se détachent nettement.

2° *Coloration à la fuchsine acide.* — On dépose sur la lame contenant les coupes quelques gouttes de la solution suivante :

Eau anilinée saturée	100 cent. cubes.
Fuchsine acide	20 grammes.

On chauffe jusqu'à production de vapeurs, et on prolonge l'action du colorant pendant cinq minutes ; les coupes sont alors rincées, et on les traite par une solution aqueuse de bleu de toluidine à 0,5 p. 100 ; on régresse ensuite dans la solution suivante :

Alcool à 95°	100 cent. cubes.
Aurantia	0 ^{gr} ,5

On obtient ainsi une coloration rouge plus ou moins vive des chondriosomes et des plastes.

Ces colorations étant réalisées, nous avons traité les coupes avec les divers réactifs généraux des alcaloïdes et en particulier avec le réactif de BOUCHARDAT.

Les coupes sont ensuite lavées, déshydratées et montées dans une goutte de baume du Canada.

CHAPITRE II

LOCALISATION DE LA NICOTINE DANS L'ENSEMBLE DE LA PLANTE DE TABAC

Dans le présent chapitre, nous nous proposerons d'étudier la répartition de la nicotine dans la graine sèche, à l'état de vie ralentie, ensuite dans la plantule, enfin dans la plante adulte.

Une étude systématique ainsi comprise ne paraît avoir été faite sur aucune plante alcaloïfère, les auteurs s'étant généralement bornés à étudier la répartition des alcaloïdes à un stade déterminé, et généralement dans la plante adulte.

Nous négligerons pour l'instant les faits de localisation dans l'épiderme, qui, en raison de leur importance, seront traités dans un chapitre spécial.

Les différents auteurs qui se sont occupés de localisations ont vu surtout dans leurs recherches un moyen de déceler de nouveaux alcaloïdes inconnus. Ce n'est évidemment pas le but que nous avons poursuivi.

L'alcaloïde étant connu, les essais de localisation peuvent aussi avoir un autre intérêt, la technique de l'extraction tirera profit des données microchimiques qui complèteront ou contrôleront les résultats apportés par l'analyse chimique. Ils pourront, d'autre part, nous renseigner sur la partie de la plante la plus riche en principe actif et nous permettront de savoir à quelle époque de l'année la teneur alcaloïdale est à son point culminant. Les essais de localisation, ainsi envisagés, seront d'un intérêt incontestable, particulièrement dans le Tabac.

Mais, à notre avis, ces résultats ne doivent pas suffire ; nous devons plutôt considérer les essais de localisation comme un moyen nous permettant d'approfondir nos connaissances

si imparfaites sur la signification biologique des principes actifs.

En effet, en procédant d'une manière systématique à la recherche microchimique de l'alcaloïde dans la plante, à tous les stades de son développement, nous pourrons voir si l'alcaloïde persiste dans toutes les cellules issues des méristèmes. Nous préciserons si, dans une région déterminée, la formation des précipités est aussi intense pendant toute la vie dans chacune des cellules; s'il n'existe pas des régions de prédilection où l'alcaloïde s'accumule, ou encore des régions où la synthèse alcaloïdale est plus active.

De telles recherches devront nous renseigner sur les migrations des alcaloïdes et, par ce fait même, nous apporter leur contribution sur leur signification biologique et, d'autre part, nous permettre d'envisager des moyens de contrôle physiologique très importants.

Nous ne méconnaissons pas les critiques que l'on a faites et que l'on peut faire aux études de localisation; aussi est-il indispensable d'insister sur les points suivants :

1^o Dans tout essai de localisation, l'intensité de la réaction obtenue ne peut être appréciée d'une façon certaine qu'au point de vue qualitatif, la notion quantitative restant éminemment subjective et demeurant du domaine de la chimie.

2^o Les localisations ne doivent être faites, en ce qui concerne les alcaloïdes, que sur des tissus frais; dès que la cellule meurt, le cytoplasme devient perméable; le principe actif peut alors imprégner toute la cellule, y compris la membrane, et diffuser dans les cellules voisines. L'étude sur les matériaux d'herbiers a été ainsi très souvent entachée d'erreurs.

3^o Après tout essai de localisation, il y a lieu de s'assurer que les précipités ou colorations obtenus correspondent bien au principe actif recherché, et non à des substances de constitution chimique voisine; nous avons indiqué comment la méthode d'ERRERA permet d'éviter de telles erreurs.

4^o La réaction alcaloïdale peut être masquée ou diminuée par la présence d'autres constituants cellulaires, en particulier par les chloroplastes dans les feuilles, par l'amidon dans l'endoderme et dans les racines âgées, par l'oxalate de cal-

cium dans les plantes étiolées, ou enfin par la grande densité des matières protéiques dans les pièces florales du gynécée et de l'androcée.

5° Les coupes au rasoir faites dans les organes adultes sont indispensables, mais peuvent être une cause d'erreurs. En effet, si les coupes sont trop minces, une grande partie des cellules se vident de leur contenu ; si, au contraire, elles sont trop épaisses, la visibilité est insuffisante et l'interprétation devient difficile.

6° Enfin seules pourront être faites des comparaisons entre deux régions topographiquement très distinctes, par exemple entre les deux faces de la feuille, ou entre les régions centrales ou périphériques de la tige et de la racine, ou enfin la comparaison d'une même région ou d'un même organe au début et à la fin de la végétation.

Ces multiples causes d'erreurs imposent évidemment au chercheur une attitude très critique et très réservée, d'où la nécessité de se garder rigoureusement de jugements trop hâtifs et de procéder à un grand nombre d'examens, afin de pouvoir établir des moyennes qui, seules, apporteront des données pouvant être retenues.

Nous exposerons d'abord les résultats que nous avons obtenus par l'étude du Tabac ; puis nous les comparerons à ceux qui ont été indiqués pour les autres plantes alcaloïfères, lorsque celles-ci présenteront des différences notables.

Nous réserverons pour un chapitre suivant l'interprétation de ces faits et de ces comparaisons.

A. — Graine.

Les coupes faites à main levée dans la graine de Tabac, à l'état de vie ralentie, après coloration par la solution iodo-iodurée et par les autres réactifs déjà cités des alcaloïdes, ne présentent aucun des précipités caractéristiques de ces corps : ni dans l'albumen, ni dans les cotylédons, ni dans l'embryon.

A la surface du tégument l'on peut voir sur le frais, en l'absence de tout traitement par un réactif quelconque, une fine poussière brunâtre de granulations pigmentaires déjà

signalée par SOUÈGES ; cette coloration brune s'accroît sous l'effet de l'I³K. Il est donc très difficile et même impossible de dire que ce sont là des précipités de nicotine ; ce sont plus vraisemblablement des débris de la paroi externe et des parois radiales du tégument, qui disparaissent dans la graine mûre. Y a-t-il dans ces débris de membrane quelques résidus d'alcaloïdes ? C'est possible, mais non certain ; et, même s'il existait de la nicotine à l'extérieur de la graine, ce qui n'est pas prouvé au point de vue microchimique, cette nicotine ne ferait pas partie intégrale et définitive de la graine, que nous considérons donc comme dépourvue de tout principe actif.

L'absence d'alcaloïdes dans les graines de Tabac est d'ailleurs admise par DE TONI (essais microchimiques), par DUBRISAY et STOQUER (1), par KURT MOTHES ; celui-ci considère que les graines de la plante de Tabac sont pratiquement dépourvues d'alcaloïdes et enfin par ILIYN (analyses chimiques).

MOLLE trouve de la nicotine à l'extérieur du tégument des graines de *Nicotiana macrophylla*. CLAUTRIAU dit que la nicotine que l'on a cru trouver dans la graine de Tabac provient d'impuretés.

ALBO signale l'absence de nicotine dans les graines de Tabac, mais soutient l'existence probable d'un principe alcaloïdique (?) qui serait la solanine.

Johannes STARKE reprend les recherches d'ALBO et, par une série d'expériences et d'analyses chimiques très bien conduites, prouve que la présence de la solanine ne saurait être admise ; mais cherchant, par la méthode de STASS, s'il n'existerait pas un alcaloïde, il trouve de la nicotine qu'il caractérise « par son odeur tout à fait typique », sans avoir fait aucune réaction chimique la déterminant d'une façon certaine ; ce résultat ne saurait donc être retenu. Par ailleurs, STARKE donne à cette nicotine la même origine que MOLLE et CLAUTRIAU.

PERREAU et FOUQUET s'occupent du même problème et trouvent dans les graines une ou deux parties de nicotine pour

(1) Communication verbale.

10 000 parties de matière sèche ; mais ils ont bien soin d'ajouter : « Nous avons tenu compte des impuretés des graines dépouillées de leurs enveloppes. »

Plus récemment, deux savants viennois, KLEIN et HERN-DHOLFER, par un procédé très complexe de microdistillation avec réaction au bromure de sodium et au chlorure d'or, en présence de l'eau de chaux, parviennent à extraire et à doser la nicotine à partir de la graine, mais il y a lieu de faire quelques réserves au sujet de ces nouvelles données, car les matières protéiques subissent dans la microdistillation une hydrolyse, et leurs réactions sont alors très voisines de celles des alcaloïdes ; mais ici encore la nicotine peut provenir des débris du tégument externe désorganisé.

Les analyses chimiques n'apportent donc aucune donnée sérieuse en faveur de la présence de la nicotine dans la graine de Tabac ; elles sont, au contraire, de nature à confirmer les résultats des essais microchimiques tentés par nous-même et par divers auteurs. De tout cet ensemble de recherches se dégage cette conclusion : *la graine de Tabac est dépourvue d'alcaloïdes.*

B. — Plantules.

Nos essais de localisation ont porté soit sur toute la plante, soit sur des organes entiers séparés (racine, axe hypocotylé, cotylédons), écrasés entre lame et lamelle, les coupes étant impossibles dans les jeunes plantes fraîches.

Dans la plantule de 3 millimètres de longueur, la nicotine est visible dans les cellules du point végétatif de la racine, sous des aspects que nous aurons ultérieurement l'occasion de décrire. Un peu au-dessus de cette région méristématique, les précipités envahissent la majeure partie de la cavité cellulaire, et il existe une tendance très prononcée à une coloration plus intense des cellules périphériques du parenchyme cortical.

Les cellules de la coiffe sont largement pourvues d'alcaloïdes ; l'assise pilifère en contient aussi. Dans les poils absorbants, l'intensité des précipités est très variable suivant

l'âge de ces organes, alors que l'on obtient une réaction alcaloïdale dans les jeunes poils en voie de croissance ; l'I³K ne donne aucune réaction dans les poils âgés ; la présence de la nicotine y est donc très éphémère.

L'axe hypocotylé se colore moins rapidement que la racine, la solution I³K pénétrant beaucoup plus difficilement dans les cellules de cette région, où l'on peut constater la présence de nicotine dans presque tous les éléments, avec prédominance de la réaction dans les régions périphériques, mais avec une intensité bien moindre que dans la racine.

Dans le haut de l'axe hypocotylé (région sous-cotylédoinaire) se produit une courbure provenant de la forme de l'embryon qui est légèrement arqué, et on constate, dans la convexité de cette courbure, qui ne persiste que peu de temps, une réaction alcaloïdale qui est beaucoup plus prononcée que dans la partie concave.

A ce stade, les cotylédons sont encore incolores et peu développés ; les précipités de nicotine y sont rares.

Dans la plantule de 5 millimètres environ de longueur, la différenciation des diverses zones et tissus est plus accentuée, et nos essais de localisation y ont donné les résultats suivants :

Dans la racine, au-dessus du point végétatif qui contient toujours de l'alcaloïde, se trouve le procambium, qui donnera naissance aux éléments du tissu conducteur ; tant que ces éléments ne sont pas différenciés, ils sont riches en alcaloïdes, mais, dès qu'ils entrent en fonction, lorsque les premiers vaisseaux présentent leur ornementation, la nicotine disparaît ; et, dans toutes les autres régions de la plantule, les vaisseaux et les tubes criblés ne donnent jamais aucune réaction alcaloïdale.

La région périphérique de la moelle, dans toute la plantule, est riche en alcaloïdes beaucoup plus que dans le stade précédemment décrit.

Les autres régions de la racine ne présentent pas de différence notable avec celles de la plantule plus jeune.

Dans les cotylédons verdissants à ce stade, les réactions sont rendues difficiles, mais on peut voir des précipités abondants dans l'épiderme.

Entre les deux cotylédons, se trouvent le point végétatif de la tige et de très jeunes ébauches foliaires, qui accusent une réaction alcaloïdale dans toutes leurs cellules.

Les deux stades que nous venons de décrire ont été observés sur des plantes poussées sur du papier buvard humide dans des boîtes de PETRI; la plantule arrive ainsi à une longueur de 10 millimètres environ, puis, par suite de manque d'aliments et des conditions défavorables, le développement s'arrête, mais la plante ne meurt pas immédiatement d'inanition, si la culture est faite en boîte close et si l'on a soin de lui fournir de l'eau; elle peut végéter ainsi sans accroissement pendant environ un mois. Mais on assiste alors à une perte graduelle d'alcaloïdes dans toutes les régions de la plantule; la disparition commence à se produire dans les cotylédons et dans les ébauches foliaires qui ne s'accroissent plus; enfin, dans les parties profondes de l'axe hypocotylé, la nicotine demeure quelque temps. Dans la racine en particulier, près du point végétatif, elle persiste encore longtemps; mais, peu avant la mort de la plante, l'alcaloïde disparaît aussi de cette région, et la coloration brune que l'on obtient alors est due aux matières protéiques, et l'ensemble de la plante peut être considéré comme dépourvu d'alcaloïdes. Il y a là un phénomène curieux sur lequel nous aurons l'occasion de revenir.

JACQUEMIN avait fait des constatations à peu près semblables dans les cotylédons des Légumineuses où l'alcaloïde disparaissait.

Cette série de localisations contrôle les données chimiques apportées par PERREAU et FOUQUET d'une part, qui trouvent 2 à 5 parties de nicotine pour 10 000 parties de matière sèche dans les jeunes plantules, jusqu'à l'apparition de « la matière verte dans les cotylédons », et par G. KLEIN et HERN-DHOLFER d'autre part. Elle complète également les analyses de DUBRISAY et STOQUER, qui n'avaient pu déceler la nicotine qu'au trente-troisième jour de la germination et la doser qu'au quarante-quatrième jour (0^{gr},064 de nicotine pour 100 grammes de plantes fraîches), et celles de CHUARD et MELLET, qui indiquent des traces de nicotine seulement au vingtième jour de végétation.

C. — Plante en voie de croissance.

a. — RACINE.

L'étude de la répartition des alcaloïdes, faite sur des coupes transversales dans la partie moyenne de la racine, donne les résultats suivants :

Le principe actif existe dans la moelle avec accentuation dans la région périphérique.

Dans le parenchyme libérien interne, la coloration est très intense.

On trouve quelques précipités dans les rayons médullaires non sclérifiés.

Les vaisseaux sont dépourvus d'alcaloïdes. La réaction se produit, mais avec peu d'intensité, dans la zone génératrice libéro-ligneuse et dans le parenchyme libérien externe.

L'endoderme, facilement reconnaissable par sa teneur en amidon, en est largement pourvu.

Dans le parenchyme cortical, la réaction est fortement positive dans toutes les cellules, mais avec une accentuation marquée dans la région externe.

Les cellules de la zone génératrice externe en sont légèrement pourvues, mais la nicotine ne semble pas persister dans les vieilles cellules externes du liège; pour la racine âgée, l'interprétation de la réaction dans ce tissu est d'ailleurs difficile, car les éléments sont souillés par la présence des débris du sol; il est vraisemblable que la nicotine disparaît de ces cellules ne contenant plus de cytoplasme et que l'on considère comme mortes.

Dans la racine plus âgée, la moelle se sclérifie ou est envahie par les vaisseaux et ne présente pas d'alcaloïdes; la nicotine persiste seulement avec intensité dans les régions périphériques de l'écorce.

A la *fin de la végétation*, toutes les cellules se remplissent d'amidon, qui masquent les réactions, mais, dans l'ensemble, la teneur alcaloïdale est beaucoup moins grande.

Nos résultats sont en conformité avec ceux obtenus par les chimistes PERREAU et FOUQUET, qui, en séparant grossière-

ment les régions périphériques des régions centrales, trouvent toujours une plus grande quantité d'alcaloïdes dans l'écorce que dans le cylindre central ; il y a toutefois lieu de tenir compte que ces auteurs n'ont pas considéré « des ensembles bien définis de tissus ».

Au point de vue de la disparition du principe actif dans les racines âgées, nos résultats sont comparables à ceux de CHUARD et MELLET, qui notent une diminution de nicotine dès les premiers gels (0^{gr},47 le 6 novembre, au lieu de 0^{gr},64 le 18 septembre et 0^{gr},68 le 2 août).

b. — TIGE.

L'étude du point végétatif de la tige dans toute la région méristématique, aussi bien pour le massif initial que pour les ébauches foliaires, doit être faite sur des coupes longitudinales : les réactions que nous opérons dans les coupes donnent des résultats à peu près analogues à ceux de la racine ; mais, les cellules étant très petites, il faut examiner soigneusement la préparation pour y discerner les précipités ; autour du méristème, se produit la différenciation cellulaire des jeunes ébauches foliaires, qui ont alors toutes leurs cellules riches en principe actif ; vers le bas de ce méristème se différencient les régions de la tige.

Dans l'écorce très jeune, toutes les cellules sont pourvues de nicotine, mais la teneur alcaloïdale va en diminuant de l'épiderme jusqu'à l'endoderme ; la région du procambium devant donner les éléments conducteurs en contient aussi, mais, dès que les vaisseaux et les tubes criblés sont nettement caractérisés, la nicotine disparaît, et nous ne la retrouverons plus du tout par la suite dans ces éléments. La région médullaire donne une réaction intense.

Les bourgeons axillaires se comportent, au point de vue de la teneur en nicotine des éléments méristématiques, d'une façon identique au bourgeon principal.

Les coupes transversales, dans un *entre-naud* d'une tige en voie de croissance, permettent de mieux limiter les différentes régions et de procéder à une étude plus précise des réactions.

Toutes les cellules de la moelle sont riches en principe actif; la nicotine s'y présente sous forme de précipités granuleux, réguliers, mais peu denses. Dans la région externe de la moelle, cellules en contact avec le parenchyme libérien interne, la teneur augmente considérablement, et elle est maxima dans les cellules du parenchyme libérien avoisinant ou séparant les tubes criblés; dans certaines cellules, les précipités sont si serrés qu'ils donnent un aspect noirâtre à la coloration, et de tels éléments se distinguent nettement de leurs voisins. *

Les rayons médullaires, encore cellulodiques, contiennent quelques précipités alcaloïdaux; la zone génératrice externe accuse une réaction légère.

Les éléments du parenchyme libérien externe donnent une réaction moyenne, mais certaines cellules, moins nombreuses que dans le parenchyme libérien interne, accusent l'aspect noirâtre déjà signalé; il y a lieu de noter qu'ici les tubes criblés sont moins nombreux que dans le liber interne.

L'endoderme se colore vivement grâce à ses grains d'amidon, mais on peut toutefois y distinguer assez facilement des précipités granuleux de nicotine.

Le parenchyme cortical est pourvu d'alcaloïdes dans toutes ses cellules, mais, d'une manière inégale, alors que certaines présentent des précipités peu denses analogues à ceux de la région centrale médullaire, d'autres sont vivement colorées en brun. Toutefois, dans la région périphérique (deux ou trois dernières assises), la coloration est beaucoup plus intense et homogène dans toutes les cellules.

Dans l'épiderme et les poils, la répartition est inégale et la réaction donne des images que nous étudierons plus loin.

Dans la tige à la *fin de la végétation*, nous constatons une diminution très notable de nicotine dans toutes les régions, et en particulier dans la moelle. Les rayons médullaires qui se sont sclérifiés ont perdu leur alcaloïde; le parenchyme cortical en est aussi moins pourvu, sauf dans les entre-nœuds, où se sont produits des repousses de bourgeons, et où l'intensité de la réaction est toujours aussi grande, et la réparti-

tion analogue à celle que nous avons décrite pour la tige en voie de croissance.

Les coupes pratiquées au niveau d'un nœud doivent retenir notre attention ; si une telle coupe est faite alors que le bourgeon axillaire est en voie de formation, la teneur alcaloïdale est analogue à celle que nous avons constatée dans la région de l'entre-nœud. Mais, dès que le bourgeon se développe, une activité corrélative se manifeste dans tous les éléments de la tige, particulièrement au niveau de raccord du nouveau rameau et de la tige mère, situé par conséquent un peu au-dessus du raccord de la feuille où le bourgeon a pris naissance ; cette activité s'accompagne d'une augmentation très notable de nicotine, en particulier dans la région périphérique de la moelle, voisine de la région de raccord, et dans le parenchyme libérien de cette même région.

De même, les cellules du parenchyme cortical qui sont voisines de celles où vont se différencier les éléments conducteurs de raccord, entre le bourgeon et la tige mère, sont beaucoup plus riches en principe actif. Alors que, dans l'entre-nœud, la répartition de l'alcaloïde se fait d'une manière identique sur tout le pourtour et suit la symétrie axiale de la tige, dans l'entre-nœud où la symétrie est détruite, c'est toute la région voisine du raccord qui est la plus riche en alcaloïdes, et ceci d'une façon très nette.

c. — FEUILLE.

Les coupes transversales faites dans les bourgeons au niveau du point végétatif montrent les jeunes feuilles en forme de croissant ; les cellules sont à l'état de méristème et présentent toutes un précipité alcaloïdal réparti d'une manière identique dans les diverses régions ; mais la différenciation est très rapide, et, à mesure qu'elle s'accomplit, il semble que l'alcaloïde se localise surtout à la périphérie, où la coloration est plus intense ; cependant la nicotine ne disparaît pas des régions centrales, où seuls les éléments de la nervure correspondant aux vaisseaux et aux tubes criblés en sont dépourvus.

Dans les feuilles plus âgées et en voie de croissance, nous trouvons de la nicotine dans toutes les cellules de la nervure principale ; on observe ici une coloration plus accentuée dans les éléments du parenchyme libérien supérieur, correspondant au parenchyme libérien interne de la tige.

Les cellules du collenchyme en sont aussi pourvues ; dans ce tissu, la teneur alcaloïdale semble diminuer au fur et à mesure que l'épaississement cellulaire est plus prononcé ; c'est ainsi que, comparativement, le collenchyme moins épaissi des nervures secondaires est plus riche en alcaloïdes.

D'une façon générale, dans la nervure, c'est toujours la moitié supérieure qui donne les précipités les plus intenses par rapport à la moitié inférieure.

Dans le *limbe*, la localisation est rendue beaucoup plus difficile par la présence des chloroplastes ; mais, si l'on a soin de procéder aux réactions directement sous le microscope, entre lame et lamelle, on voit apparaître très rapidement les précipités alcaloïdaux avant que le noircissement des chloroplastes ne soit très prononcé ; on peut ainsi apprécier l'intensité de la réaction alcaloïdale, qui est plus grande dans le parenchyme palissadique que dans le parenchyme lacuneux. Toutefois ces résultats restent encore imprécis.

L'examen de l'épiderme et des poils sera fait dans un chapitre suivant.

d. — ORGANES DE FRUCTIFICATION.

1^o Rameau et pédoncules floraux.

Dans ces deux parties de la plante, la nicotine est localisée comme dans la tige principale, soit au niveau des nœuds, soit au niveau des entre-nœuds.

2^o Réceptacle floral.

Il est formé de petites cellules contenant un cytoplasme très dense ; à leur intérieur, on peut voir quelques fins précipités de nicotine.

3^o Calice.

La distribution de la nicotine dans les sépales est analogue à celle que nous avons décrite dans les feuilles; on observe dans ces organes, surtout après leur épanouissement, une réaction beaucoup plus intense vers la face supérieure (1).

Après la fécondation, la nicotine diminue dans toutes les cellules des sépales.

4^o Corolle.

La répartition de l'alcaloïde est la même que dans le calice, mais bien moins accentuée; les pétales ont d'ailleurs une durée assez éphémère, et, après la fécondation, ils se flétrissent et tombent.

*5^o Androcée.**Étamines.*

a. *Filet*. — La nicotine peut être décelée surtout dans les parties périphériques et autour du faisceau libéro-ligneux, mais en faible quantité.

b. *Anthère*. — La nicotine est nettement abondante dans l'épiderme; on peut aussi voir quelques précipités dans l'assise mécanique, dans toutes les autres régions (assise nourricière, cellules mères des grains de pollen); l'abondance des matières protéiques rend toute interprétation difficile, même avec la méthode d'ERRERA; toutefois il semble bien que ces deux régions possèdent quelques précipités granuleux attribuables aux alcaloïdes, mais le résultat est douteux.

Le grain de pollen formé est totalement dépourvu de principe actif.

6^o Gynécée.

a. *Stigmate*. — La réaction est nettement caractérisée

(1) On remarque que les poils n'apparaissent sur l'épiderme supérieur des sépales de la fleur de Tabac que lors de leur épanouissement.

dans l'épiderme; les cellules du parenchyme conjonctif et du tube nourricier présentent quelques précipités.

b. *Style*. — La présence de l'alcaloïde n'est nettement positive que dans l'épiderme.

c. *Ovaire*. — La plus grande quantité de nicotine se trouve dans les feuilles carpellaires, surtout dans la partie externe de celles-ci; c'est ensuite le tissu lacuneux des placentas qui en contient le plus; toutefois une grande partie de la coloration est due aux matières protéiques.

Dans l'enveloppe externe des ovules se forment des précipités sur lesquels nous aurons l'occasion de revenir; dès que la fécondation a eu lieu, cette assise se remplit d'amidon et ensuite de pigments; l'interprétation de la réaction est alors impossible; on assiste d'ailleurs auparavant à une disparition graduelle de la nicotine suivant un processus que nous indiquerons plus loin.

Nous n'avons pas obtenu des résultats précis pour les autres régions de l'ovule; les assises tégumentaires sont rapidement digérées suivant un processus indiqué par SOUÈGES: « Il ne subsiste après la fécondation que quelques travées cellulaires sans importance. »

Dans les régions centrales du nucelle et du sac embryonnaire, il ne paraît pas exister de principe actif; d'ailleurs, comme dans les régions profondes de l'anthère, la grande densité des matières protéiques rend toute appréciation microchimique impossible.

D'une manière générale, la teneur alcaloïdale dans les cellules des divers verticilles va en diminuant après la fécondation.

MOLLE, dans son étude microchimique sur les Solanacées, signale la présence de nicotine dans les cellules qui entourent le sac embryonnaire de l'ovule de la plante de Tabac; mais, dit-il, la nicotine disparaît peu à peu de l'assise nourricière; nous croyons que, sous ce nom, MOLLE veut décrire les assises internes et moyennes qui se résorbent. Nos résultats diffèrent donc très peu de ceux de cet auteur.

Comparaison de la localisation des alcaloïdes dans le Tabac et dans d'autres plantes alcaloïfères.

Nous nous proposons, ici, de confronter succinctement avec les faits que l'on vient d'exposer les résultats les plus nets obtenus par divers chercheurs concernant la localisation d'alcaloïdes chez des plantes appartenant en général à d'autres familles que les Solanacées.

Il importe de souligner que ces résultats, essentiellement fragmentaires, réclament des vérifications et surtout des compléments; aucune plante alcaloïfère en effet, n'a été l'objet à notre connaissance, au point de vue de la localisation des principes actifs, de recherches systématiques et détaillées fournies par nous sur le Tabac.

1^o Graines.

L'absence de principe actif dans les graines des plantes alcaloïfères est plutôt exceptionnelle; la majorité des semences contiennent des alcaloïdes soit dans l'albumen, soit dans l'embryon.

Des particularités curieuses nous sont fournies par certaines plantes alcaloïfères: c'est ainsi que, dans *Peganum Harmala*, l'alcaloïde est seulement localisé dans la graine, à l'exclusion de toutes les autres parties de la plante. La caféine est absente des graines de Thé, tandis qu'elle est abondante dans celles du Café (CLAUTRIAU).

Pour certaines graines, la présence d'alcaloïdes y est très discutée, surtout quand la localisation est seulement positive dans les assises externes du tégument, assises qui sont très souvent en voie de dégénérescence et où la localisation est rendue difficile. Aussi passerons-nous sous silence toutes les graines de cette catégorie.

Nous noterons l'absence complète d'alcaloïdes dans les graines d'*Adonis vernalis*, *Nuphar luteum*, *Nymphaea alba*, *Papaver somniferum*, *Physalis Alkekengi*, *Salpiglossis sinuata*, *Nicandra physaloides*, et enfin les graines des différentes

espèces du genre *Senecio*, plantes dont les parties végétatives sont au contraire pourvues d'alcaloïdes.

2^o Plantules.

LUTZ, par une série d'analyses chimiques, prouve que l'alcaloïde des Seneçons n'est pas apparu dans la plante après trois mois de végétation.

Dans *Papaver somniferum*, la plantule, haute de quelques centimètres, ne donne aucune des réactions de la morphine ; celle-ci apparaît d'abord dans le latex, lorsque la plante possède quatre à cinq feuilles assez développées, et que la hauteur est de 10 à 15 centimètres ; mais à ce stade les autres parties de la plante en sont dépourvues (CLAUTRIAU).

Les autres plantes provenant des graines dépourvues d'alcaloïdes n'ont pas été étudiées au point de vue du début de l'apparition du principe actif.

Les plantules ont été généralement très peu étudiées, et si certains auteurs ne s'en sont pas préoccupés, c'est que les techniques de l'étude vitale que nous aurons l'occasion d'exposer étaient peu connues ; et il est à supposer qu'ils procédaient aux essais de localisation, lorsque seulement les coupes étaient praticables.

Seul JACQUEMIN étudie certaines plantules alcaloïfères, et les résultats qu'il obtient sont dans leur ensemble identiques aux nôtres. Dans ses recherches sur la localisation de l'anagrine, dans *Anagris fœtida*, JACQUEMIN trouve que tous les jeunes éléments renferment de l'alcaloïde, à l'exception des vaisseaux du bois et des fibres ; le point végétatif et la coiffe en sont très riches. Cet auteur fait des constatations semblables dans *Pithecolobium Saman*, où il examine une plantule ou « la plumule n'était pas encore sortie d'entre les cotylédons, et dont la racine était longue d'à peine 1 centimètre ».

3^o Plantes adultes.

Des nombreuses recherches faites dans les plantes adultes, on peut retenir que les localisations des alcaloïdes ont lieu

suivant un mode très général, dans son ensemble analogue à celui que nous avons longuement décrit pour la plante de Tabac ; c'est-à-dire que l'on trouve des alcaloïdes dans tous les tissus, avec accentuation marquée dans les différentes régions périphériques ; toutefois il y aurait absence d'alcaloïdes dans les vaisseaux et les tubes criblés.

La diminution de la teneur alcaloïdale dans les plantes âgées est aussi un fait souvent signalé et sur lequel nous aurons l'occasion de revenir.

Dans la très importante littérature ayant trait aux localisations, il est intéressant de noter qu'un certain nombre de plantes alcaloïfères sont décrites comme n'accusant aucune réaction dans les points végétatifs de la tige et de la racine ; mais l'on peut se demander si, dans ces plantes, les précipités peu nombreux des régions méristématiques à l'intérieur d'éléments que nous décrirons dans le chapitre suivant et dont la connaissance est récente n'ont pas échappé à l'examen des chercheurs.

Pour les autres régions de la plante, nous noterons les particularités suivantes :

Les alcaloïdes des Seneçons se trouvent exclusivement dans les parties souterraines et sont absents des parties aériennes (LUTZ).

Dans *Nigella damascena*, la réaction n'est positive que chez certains individus ; il existerait une influence du milieu de culture ; les sols riches donneraient des plantes très alcaloïfères, et cette teneur diminuerait chez les plantes se développant dans un sol pauvre qui contiendraient peu ou pas du tout d'alcaloïdes (VANDERLINDEN).

La tige de *Catsetum tabulare* ne présente pas de trace d'alcaloïdes dans aucun de ses tissus ; ceux-ci se trouveraient seulement dans les épidermes (DE DROOG).

La racine, les rhizomes et les bourgeons souterrains d'*Adonis vernalis* contiennent un alcaloïde, tandis que les tiges adultes et les feuilles ne donnent aucune réaction. VANDERLINDEN, qui s'est occupé de cette localisation, fait remarquer que les tiges et feuilles qu'il avait à sa disposition avaient souffert de la sécheresse. Le même auteur trouve que, dans la feuille

d'*Aconitum Anthora*, l'alcaloïde existerait dans le pétiole, et le limbe en serait dépourvu.

D'après DE DROOG et DE WILDEMAN, l'alcaloïde ferait défaut dans l'épiderme et dans les assises sous-épidermiques de *Dendrobium nobile*.

VANDERLINDEN pense que, dans *Aconitum Lycoctonum*, l'alcaloïde se trouve dans le liber de la feuille et que tout le limbe en est dépourvu.

L'absence d'alcaloïdes est presque générale dans les tubes criblés. Toutefois ALBO dit qu'il existe de la colchicine dans les formations criblées de *Colchicum autumnale*, mais il n'arrive pas à déceler cet alcaloïde microchimiquement.

GUÉRIN trouve de la cytisine dans les tubes criblés de *Cytisus Laburnum* et de l'anagyrine dans ceux d'*Anagyris foetida*.

VANDERLINDEN obtient quelques faibles réactions dans les tubes criblés au voisinage des cribles dans *Caltha palustris*.

CHAPITRE III

LE LIEU DE FORMATION DE LA NICOTINE DANS LA CELLULE

Dans le chapitre précédent, nous avons vu que l'alcaloïde n'existait pas dans la graine, mais que nous trouvions le principe actif dans la plantule de 3 millimètres. Nous devons donc chercher à établir à quel moment exact l'alcaloïde apparaît dans les cellules, et ensuite quelle est la partie de l'élément cellulaire qui est le siège de cette élaboration ; nous verrons enfin quels sont les constituants du protoplasme qui peuvent éventuellement jouer un rôle dans la production de l'alcaloïde (1).

Notons d'abord que, dans certaines plantes alcaloïfères, les localisations chimiques n'ont pas pu être faites, la présence de l'alcaloïde n'ayant alors été décelée que par l'analyse chimique. C'est ainsi que SCHIMPER écrit que la localisation microchimique de la caféine est impossible.

MOLISCH parvient à obtenir des réactions microchimiques avec le même alcaloïde, sans pouvoir toutefois situer le siège de la réaction.

CLAUTRIAU, dans son important travail : *Sur la nature et la signification des alcaloïdes végétaux*, s'exprime ainsi au sujet de la caféine dans le Théier et le Caféier : « Malgré les nombreux essais sur un matériel très abondant, je ne suis pas arrivé à mon but, qui était de caractériser l'alcaloïde à l'intérieur des cellules. »

D'autres recherches donnent pour lieu de formation des alcaloïdes les membranes cellulaires ; ce sont celles de

(1) Des notions élémentaires sur la constitution morphologique du protoplasma auraient peut-être eu leur place au début de ce chapitre ; nous renvoyons le lecteur auquel les notions de cet ordre ne seraient pas familières à l'excellent ouvrage de MANGENOT.

BÆDEKER pour la berbérine; celles de HERDER pour les alcaloïdes de *Fibraurea chloroleuca*; de BORSCOW pour la vératrine dans *Veratrum album*.

A. GUILLAUME ne parvient pas à faire la localisation nette des alcaloïdes dans les cotylédons de *Lupinus variabilis* à cause de l'abondance des matières protéiques.

JACQUEMIN, s'occupant de la localisation de la lupinine dans les Légumineuses, trouve que, dans le limbe, l'alcaloïde apparaît sous la forme d'un fin pointillé, entourant les chloroplastes et formant un fin réseau, ce qui laisserait supposer que les alcaloïdes se forment au sein même du cytoplasme.

Ce ne sont d'ailleurs pas là que des exceptions; dans la généralité des cas, en effet, les auteurs admettent que les alcaloïdes se forment dans le protoplasme, mais sans pouvoir préciser dans quels constituants de celui-ci; c'est ainsi que, dans leurs travaux devenus classiques et dont l'autorité est reconnue, ERRERA et ses élèves écrivent : « Dans la majorité des cas, les alcaloïdes se trouvent certainement à l'intérieur des cellules, dissous dans le suc cellulaire aqueux, peut-être, chez certaines espèces dans l'huile ou les matières mucilagineuses. »

On voit combien ces données sont imprécises, et, depuis 1887, date des travaux de l'école belge d'ERRERA, la littérature ayant trait à la microchimie des alcaloïdes n'apporte aucune contribution nouvelle à la question du siège des alcaloïdes dans la cellule; mais il ne faut pas perdre de vue que les méthodes cytologiques étaient alors très imparfaites, et les réformes produites dans ce domaine par l'œuvre de GUILLIERMOND n'ont eu, jusqu'à présent, aucune répercussion dans le domaine de la microchimie.

Il nous a donc semblé qu'il serait intéressant d'appliquer les techniques cytologiques modernes, et notamment les méthodes de coloration vitale à l'étude du lieu de formation des alcaloïdes. Ce sont nos résultats que nous exposons ci-dessous.

I. Les coupes faites dans la graine soit à main levée, soit à l'aide du microtome à congélation, et traitées par le réactif

iodé, et les réactifs généraux des alcaloïdes ne présentent à l'intérieur de l'amande (plantule et albumen), ainsi que nous l'avons déjà décrit, aucune trace d'alcaloïde.

L'étude cytologique des cellules de la graine montre, par ailleurs, qu'elles contiennent dans tous leurs éléments des matières grasses qui réduisent l'acide osmique et accusent une réaction positive avec le bleu d'indophénol naissant.

A côté de ces globules graisseux et en demeurant indépendants, l'on trouve de nombreux grains d'aleurone, qui résultent, ainsi qu'il a été démontré, de la déshydratation des vacuoles fluides et qui se présentent sous forme de corpuscules de nature protéique, mélangés à d'autres substances de nature phosphatée; ces grains sont situés non seulement dans les cellules de l'albumen, mais aussi dans toutes celles de l'embryon (fig. 1).

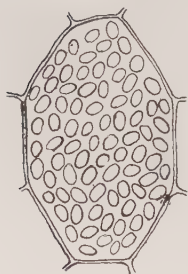


Fig. 1.

Nous avons tenté de réaliser sur les coupes de la graine les colorations vitales, à l'aide de la solution aqueuse de rouge neutre, et nous n'avons pas pu obtenir de résultat positif.

II. Les graines sont ensuite mises en germination sur du papier buvard humide dans une boîte de PETRI, à la température du laboratoire.

Le premier jour, la graine se gonfle par hydratation; le tégument paraît intact; des échantillons de graine sont alors prélevés, et l'on procède aux coupes, qui sont traitées par le réactif de BOUCHARDAT; celui-ci n'accuse aucune réaction alcaloïdale, et les essais de coloration vitale demeurent aussi sans résultat. Il en est de même les jours suivants, et ceci pendant toute la période où l'embryon reste emprisonné dans le tégument.

III. Dès qu'apparaît sur le tégument une petite tache blanche située dans la région du micropyle et correspondant à la pointe de la jeune radicule, on procède à la série d'examens suivants :

1^o Par une légère pression sur le tégument, il est possible d'expulser l'embryon en entier, sur lequel restent adhérents des fragments d'albumen non digéré; les plantules embryonnaires, rendues ainsi libres, sont disposées sur la lame porte-objet et colorées à l'aide de la solution de rouge neutre dilué. On procède ensuite à un léger écrasement entre lame et lamelle. L'examen microscopique montre que les grains d'aleurone ont participé au gonflement général des tissus par absorption d'eau et sont passés de l'état solide à l'état semi-fluide, donnant ainsi naissance aux premières vacuoles colorables alors avec la solution de rouge neutre. Certains de ces grains les plus hydratés présentent des précipités fortement colorés en rouge; d'autres, au contraire, moins volumineux, donc moins hydratés, contiennent encore à leur intérieur leur cristalloïde et leur globoïde; ces deux inclusions ne sont pas colorées, tandis que la masse fondamentale protéique accuse une coloration rouge (fig. 2).

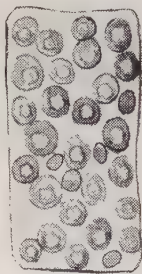


Fig. 2.



Fig. 3.

La présence du globoïde demeure exceptionnelle et correspond à un stade d'hydratation peu prononcée, mais le cristalloïde persiste bien après la disparition du globoïde.

Sans déplacer la préparation, on dispose entre lame et lamelle un fragment de papier-filtre ou de papier buvard qui absorbe la solution de rouge neutre, et simultanément, du côté opposé, on introduit à l'aide d'une pipette, quelques gouttes de la solution de BOUCHARDAT, qui ne tarde pas à prendre la place de la solution de rouge neutre.

On voit alors se produire à l'intérieur de certains grains d'aleurone semi-fluides, et encore légèrement teintés en rouge, une coloration jaune homogène, caractéristique des matières protéiques, lesquelles sont en voie de dissolution dans la vacuole. Dans d'autres grains, la coloration jaune est accompagnée de la formation au sein même des grains d'aleurone

de fins précipités granuleux de couleur brune caractéristiques des alcaloïdes (fig. 3); des précipités identiques existent aussi, mais en plus petit nombre, dans les vacuoles qui contiennent encore leur cristalloïde (1).

2^o Dans les graines en voie de germination, et où nous séparons comme précédemment la plantule de son tégument, nous procédons à une coloration avec le réactif iodo-ioduré. Nous obtenons des résultats identiques à ceux de la série précédente, mais avec plus de netteté dans la formation des images (fig. 4). Les précipités très fins apparaissent dans certaines vacuoles, alors que d'autres en sont dépourvues; et il ne semble pas y avoir de régions de prédilection pour l'un ou l'autre de ces cas, la présence des premières vacuoles alcaloïfères pouvant se constater dans n'importe quelle région de la jeune plantule.



Fig. 4.

IV. Lorsque la germination est un peu plus prononcée, alors que la racicule est extérieure au tégument, mais que celui-ci recouvre encore les autres parties de l'embryon, nous renouvelons la même série d'examen :

1^o Par une légère pression sur le tégument, nous séparons la petite plante, que nous colorons vitalement suivant la technique déjà citée. Nous constatons que la liquéfaction des grains d'aleurone est plus prononcée que précédemment; ceux-ci semblent même avoir complètement disparu dans les cellules situées à l'extrémité de la racine (méristème primaire de la racine). Dans cette région, les vacuoles mitochondriformes qui se sont formées donnent dans leur

(1) Il est intéressant de souligner que, dans ce cas, et dans d'autres cités au cours de ce chapitre, nous avons obtenu la précipitation de l'alcaloïde par I^3K , à l'intérieur des vacuoles encore spécifiquement colorées, c'est-à-dire dans une cellule où l'architecture était demeurée morphologiquement intacte. Les cas de localisation microchimique précise d'un produit à l'intérieur d'une partie de la cellule, en d'autres termes les cas de localisation d'ordre cytochimique sont rares; nous ne connaissons guère, comme répondant entièrement à cette définition, que la localisation par le bleu de crésyl des iodures dans les vacuoles, phénomène bien étudié récemment par MANGENOT.

ensemble une coloration intense. Des constatations analogues ont été faites par GUILLIERMOND, DUFRÉNOY et LABROUSSE, qui, faisant germer, comme nous l'avons déjà signalé, des graines de Tabac dans un milieu synthétique additionné de rouge neutre, trouvent que le colorant s'accumule dans les cellules méristématiques.

L'axe hypocotylé très court et les cotylédons accusent une coloration rouge à l'intérieur des vacuoles provenant des grains d'aleurone, lesquels sont fortement hydratés et ne subsistent plus sous la forme solide.

Si, sur une telle préparation, on réalise simultanément la coloration avec le réactif iodé, on obtient la formation des précipités bruns au sein des vacuoles encore teintées en rouge. A l'extrémité de la racine (région méristématique), la coloration jaune foncé des matières protéiques devient alors très intense ; par cela même, les précipités caractéristiques des alcaloïdes sont moins visibles dans les vacuoles mitochondriiformes de cette région que dans les grandes vacuoles fluides des cellules adultes.

2^o En recommençant l'examen avec coloration directe des alcaloïdes, l'on aperçoit beaucoup plus nettement les précipités granuleux de couleur brune, qui sont situés dans les vacuoles entourant le noyau, cet organite occupant la majeure partie de la cellule (fig. 5).



Fig. 5.

A ce stade, il y a déjà une ébauche de localisation des alcaloïdes dans le tissu méristématique de la racine ; tissu qui est le siège d'une grande activité cellulaire, par suite des cloisonnements qui s'y préparent, alors que l'axe hypocotylé et les cotylédons n'ont pas encore commencé leur croissance.

V. Nos examens ont ensuite porté sur des plantules entièrement expulsées de leur tégument, et sur celles où ce revêtement est simplement adhérent à l'extrémité des cotylédons ; la longueur totale de telles plantules varie de 3

à 10 millimètres environ ; celles qui atteignent cette dernière taille ont leurs cotylédons verdiss.

La coloration au rouge neutre est ici plus difficile à réaliser si l'on n'a pas soin d'employer la technique indiquée par GUILLIERMOND pour la racine de Pois, et qui consiste à un écrasement léger entre lame et lamelle dans le rouge neutre dilué, de telle sorte que les cellules périphériques de l'assise corticale soient écartées ; l'on peut ainsi obtenir plus facilement une coloration des régions centrales méristématiques.

Les cellules du méristème de la racine sont en voie de division et présentent des vacuoles plus évoluées que dans les examens précédents : certaines ont la forme mitochondriale, mais se distinguent du chondriome par leur électivité pour le rouge neutre ; d'autres prennent une forme réticulée ; mais, comme le fait remarquer GUILLIERMOND, la coloration des vacuoles mitochondriformes et réticulées est très fugace à cause de leur grande fragilité ; l'examen doit donc en être assez rapide.

Tout autour de la région méristématique, sont situées des cellules plus grandes, et en voie de différenciation et où les vacuoles évoluent ainsi. Les formes réticulées se renflent soit sur leur trajet, soit à leur extrémité ; ces renflements ne tardent pas à se séparer par rupture de leur partie effilée et donnent naissance à des petites vacuoles plus ou moins arrondies, lesquelles se gonflent par hydratation, pour former des grosses vacuoles aux contours irréguliers. Dans les cellules les plus externes, ces éléments se fusionnent pour constituer une seule vacuole centrale, que nous retrouverons dans toutes les cellules des organes adultes ; le cytoplasme est alors réduit à une fine couche pariétale et périnucléaire.

Les cellules de l'axe hypocotylé se colorent avec plus de difficulté ; on observe toutefois des vacuoles aux formes réticulées dans les cellules avoisinant les vaisseaux et qui correspondent aux éléments du parenchyme libérien. Les autres cellules du parenchyme cortical ne présentent qu'une seule vacuole centrale.

La coloration des vacuoles du massif initial de la plantule ne donne pas de résultats bien précis. Il est beaucoup plus

facile d'obtenir la coloration dans les bourgeons des plantes adultes dans lesquels on peut procéder à des coupes permettant d'examiner plusieurs épaisseurs de cellules et où certains éléments conservent leur intégrité. Enfin, dans les feuilles cotylédonaire, la coloration au rouge neutre est seulement possible dans les cellules épidermiques, et, après un temps assez long, ces éléments ne montrent alors qu'une vacuole centrale.

Nous procédons ensuite, comme dans les autres séries d'examen, à la coloration additionnelle à l'aide de la solution d'iodure de potassium iodé ; comme dans les observations antérieures, on peut voir que, à la coloration rouge des vacuoles vient se superposer, dans tous les cas, sous forme de précipités granuleux, la coloration brun Kermès, qui caractérise les alcaloïdes. Toutes les cellules ne présentent pas à l'intérieur de leurs vacuoles la même intensité de précipitation ; il existe des différences notables que nous avons exposées dans le chapitre consacré à l'étude des localisations. Pour la plantule, nous ne pensons pas que ces différences de teneur alcaloïdale soient dues exclusivement aux phénomènes de migration, comme cela se produit dans les plantes adultes, mais bien à une différence de concentration du suc vacuolaire.

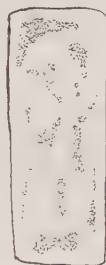


Fig. 6.

Si, dans des plantules témoins, l'on procède aux réactions microchimiques directes des alcaloïdes, on obtient toujours des images qui sont superposables avec celles obtenues à l'aide de la solution de rouge neutre ; cette superposition est particulièrement frappante dans les cellules voisines des méristèmes et possédant des vacuoles filamenteuses et où les précipités de couleur brune sont alors très denses (fig. 6).

VI. Nous avons poursuivi la double série de coloration au rouge neutre et au réactif de BOUCHARDAT dans les régions et tissus suivants :

1^o Dans les épidermes détachés de la feuille adulte qui se présentent alors sous l'aspect d'une fine pellicule transparente, on observe que : les cellules stomatiques se colorent le

plus intensément en rouge, en même temps qu'apparaissent des précipités couleur rouge vif et animés de mouvements browniens ; les autres cellules épidermiques banales ne se colorent que faiblement ; il en est de même des cellules basales des poils. Les cellules glandulaires terminales du poil accusent, au contraire, une coloration plus intense. Dans certains poils, on peut apercevoir à l'intérieur des vacuoles, principalement dans celles de cellules terminales, des petits cristaux en forme de bâtonnets qui sont animés de mouvements incessants.

La réaction à l'aide de la solution de BOUCHARDAT donne dans l'épiderme non seulement une coloration des précipités contenus dans la vacuole, mais aussi des images très différentes que nous étudierons séparément.

2° Dans le méristème du bourgeon principal de la tige, ou dans celui des bourgeons axillaires, la coloration au rouge neutre des vacuoles est obtenue sur des fragments de coupe au rasoir, ayant une épaisseur suffisante pour présenter plusieurs assises de cellules, certaines conservant toute leur intégrité. Dans de tels objets, les cellules présentent les

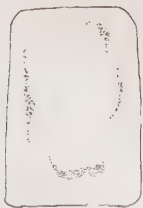


Fig. 7.



Fig. 8.



Fig. 9.

formes initiales des vacuoles (que nous n'avions pas pu observer dans le massif initial de la plantule), c'est-à-dire qu'elles sont mitochondriformes ou filamenteuses, ces dernières étant moins nombreuses et moins caractéristiques que dans les cellules du méristème de la racine. Ceci est peut-être dû à une différenciation plus rapide des éléments, le stade de vacuole unique étant atteint à peu d'intervalle du méristème.

La réaction des alcaloïdes est positive dans tous ces éléments,

même dans les vacuoles mitochondriformes, c'est-à-dire dès le premier stade de leur formation.

Une mention doit être faite ici pour les cellules du méristème libéro-ligneux (procambium), qui, très allongées, présentent des vacuoles filamenteuses riches en alcaloïde (fig. 7).

3^o Dans les jeunes bourgeons floraux, les vacuoles sont surtout visibles dans les cellules du placenta et dans celles de l'enveloppe externe de l'ovule jeune; dans cette dernière région, les formes filamenteuses et réticulées sont très typiques; les images qui se superposent après la réaction des alcaloïdes sont de la plus grande netteté (fig. 8 et 9). Les formes arrondies des vacuoles et la vacuole unique se présentent ensuite dans l'ovule plus âgé.

*
* *

Les observations que nous venons de relater apportent pour la première fois la preuve irréfutable de la localisation de la nicotine dès son apparition à l'intérieur des vacuoles. Cette conclusion nous paraît digne d'intérêt, et nous la développerons plus longuement à la fin de notre travail. Mais il ne faut pas oublier que les vacuoles ne sont pas des organites actifs de la matière vivante; elles ne sont que des lieux d'accumulation de substances solubles dans l'eau, résultant de l'activité du cytoplasme et des éléments figurés (chondriosomes, noyau) qu'il tient en suspension. Parmi ces derniers, le chondriome est particulièrement impliqué dans l'élaboration de certains produits, tels que l'amidon, certains lipides, la chlorophylle, les pigments carotinoïdes, les protéines. Il était donc légitime de rechercher si le chondriome ou tout au moins certains chondriosomes ne manifesteraient pas des signes d'activité pouvant être rapportés à l'élaboration d'alcaloïdes ou d'une substance protéique susceptible de donner directement naissance à l'alcaloïde (1).

A cet effet, nous avons eu recours aux méthodes de fixation et de coloration déjà exposées; ces fixations étant faites

(1) K. Mothes pense qu'il y a possibilité de relation entre le métabolisme nicotinique et celui d'une protéine déterminée que l'on ne sait pas isoler.

dans des régions de grande activité cellulaire, c'est-à-dire dans les méristèmes de la tige et de la racine des plantules, dans les bourgeons foliaires, divers lieux où apparaissent les premières vacuoles riches en alcaloïde. Nous avons aussi fixé des fragments de tige, de racine et de feuille adultes, pour étudier le chondriome des cellules voisines des tubes criblés, qui sont, comme nous l'avons déjà montré, des éléments très actifs dans la production de l'alcaloïde.

Le chondriome de la plante de Tabac ne présente aucune différence avec celui des autres végétaux chlorophylliens, tel que l'ont décrit GUILLIERMOND et d'autres auteurs.

Dans les cellulès du méristème de la racine, nous apercevons un chondriome constitué par des éléments en forme de grains et de bâtonnets; au-dessus du méristème, dans les cellules se différenciant en tissus, certaines mitochondries se renflent à une extrémité ou aux deux simultanément, et limitent une petite vésicule, contenant un grain d'amidon. De telles transformations sont rares dans la racine jeune, mais plus nombreuses dans la racine adulte et en fin de végétation. A côté de tels amyloplastes subsistent des mitochondries non spécialisées, que, dans l'état actuel de nos connaissances, l'on considère comme inactives.

Le chondriome des cellules méristématiques de la tige se présente sous une forme semblable à celle de la racine; dans les cellules voisines de cette région, se produit une spécialisation de certains chondriocontes, qui deviennent plus épais, se renflent en des points quelconques pour donner naissance à une ou plusieurs masses qui constituent les plastes : ceux-ci, sous l'influence de la lumière, s'imprègnent de chlorophylle et forment les chloroplastes; mais il continue à exister, parallèlement et absolument individualisées, des mitochondries non évoluées.

Dans le parenchyme libérien, le chondriome est en forme de points et de bâtonnets, éléments ne présentant aucune spécialisation, mais où les mitochondries sont très nombreuses.

Sur les préparations de ces différentes régions, nous avons essayé les divers réactifs généraux des alcaloïdes, et aucun n'a

accusé la présence de nicotine, ni de corps protéiques au sein des mitochondries. Est-ce à dire que les mitochondries et les plastes qui en sont leurs dérivés ne jouent aucun rôle dans l'alcaloïgénèse? Ce n'est pas là notre avis, car nos insuccès peuvent être dus à l'impossibilité de fixer la nicotine à l'intérieur de la cellule, comme il est possible de le faire pour les autres éléments figurés du cytoplasme, tels que l'amidon, les graisses, etc. Il est à remarquer que les techniques de fixation soumettent les objets à des bains prolongés dans l'eau, dans les alcools, qui sont des dissolvants très actifs de la nicotine. Notons enfin que le réactif de BOUIN, qui est à base d'acide picrique (réactif des alcaloïdes), ne nous a donné aucun résultat quant à la fixation des alcaloïdes à l'intérieur des vacuoles.

Mais, si l'on veut bien se souvenir que les lieux de formation des alcaloïdes sont les méristèmes, les cellules du parenchyme libérien, et en général tous les éléments à grande activité cellulaire, où le chondriome présente des éléments indifférenciés très nombreux, peut-être pourrait-on établir, sinon une liaison causale, du moins un parallèle entre leur présence et la production de la nicotine. Ceci ne constitue qu'une hypothèse, mais ces résultats, quoique négatifs, méritaient d'être cités, et cette conception nous rapprocherait de celle de NAGEOTTE, adoptée par GUILLIERMOND lorsqu'il écrit : « Rien ne nous permet de supposer que le rôle du chondriome se limite à la synthèse et à l'élaboration des substances insolubles ; il est beaucoup plus vraisemblable que, lorsque ces éléments ne présentent aucun signe d'une élaboration quelconque, ce qui est le cas pour un grand nombre d'entre eux, ils sont néanmoins le siège d'une activité chimique dont les produits se diffusent au lieu de s'accumuler. »

CHAPITRE IV

I. — COMPORTEMENT SPÉCIAL DE LA NICOTINE AU NIVEAU DES ÉPIDERMES

Nos essais de localisation microchimique de la nicotine dans la plante de Tabac nous ont montré que l'alcaloïde se formait dans toutes les cellules en voie de prolifération, ou tout au moins de type jeune (méristèmes normaux ou post-traumatiques) ; que l'alcaloïde ne persistait pas avec la même intensité dans toutes les cellules et paraissait émigrer à la périphérie des organes ; ils ont aussi démontré que la teneur alcaloïdale diminuait dans les plantes étiolées.

D'autre part, les analyses chimiques prouvent que la teneur alcaloïdale n'augmente pas indéfiniment pendant toute la vie de la plante ; elle atteint un maximum au moment de la floraison et décroît ensuite, c'est-à-dire que la nicotine disparaît alors.

Il était très intéressant de chercher s'il ne serait pas possible de suivre par des méthodes histochimiques cette disparition partielle de l'alcaloïde. Or, nous avons précisément observé des images très remarquables qui nous paraissent être en rapport avec ce phénomène. Nous rapportons ici ces observations ; mais des constatations morphologiques et microchimiques nous ont paru insuffisantes, et nous avons tenu à contrôler par des expériences les indications que nous donnait l'observation ; ce chapitre comprendra donc une autre partie : le compte rendu de ces expériences.

Observations histochimiques.

Les observations histochimiques que nous allons rapporter concernent le *comportement de la nicotine dans les assises les plus superficielles de la plante*, c'est-à-dire dans les *épidermes*.

Dans nos précédents essais de localisation, nous avons procédé, afin de déceler l'alcaloïde, soit à des écrasements dans les organes jeunes, soit à des coupes dans les organes âgés; ces deux techniques ne donnent pas de résultats probants pour l'étude des épidermes.

Pour cette nouvelle étude, nous avons eu recours à une technique, qui ne paraît pas, à notre connaissance, avoir été employée par nos prédécesseurs.

Nous avons détaché les épidermes à l'aide du scalpel et des pinces et pu ainsi étudier un tissu très transparent où les



Fig. 10. — *cs*, cellule stomatique ; *ost*, ostiole ; *ca*, cellule annexe ; *cep*, cellule épidermique.

cellules conservaient toute leur intégrité; toutefois nous avons eu recours aux coupes dans quelques rares cas, et ceci comme moyen de contrôle.

Si, dans l'épiderme inférieur d'une feuille adulte, on procède à une réaction microchimique des alcaloïdes, à l'aide du réactif de BOUCHARDAT, on est frappé par ce fait : la teneur alcaloïdale est extrêmement variable dans chaque cellule (fig. 10), dans chaque poil, dans les stomates et leurs cellules annexes; alors que certains de ces éléments sont peu ou pas pour-

vus de principe actif, les images obtenues dans les cellules où la réaction est positive présentent des aspects très différents. Dans certains, les précipités sont finement granuleux; dans d'autres, à côté des précipités granuleux, existent des petites masses homogènes colorées en brun; dans un dernier groupe, on distingue de fines gouttelettes, de couleur brun noirâtre, qui sont exsudées à l'extérieur de la membrane cellulosique.

Nous allons étudier en détail ces divers aspects dans l'ensemble de la plante. Pour la clarté de notre exposé, nous envisagerons successivement ces phénomènes dans les épidermes des feuilles, puis dans les épidermes des autres parties de la plante. Nous examinerons ensuite quels sont les facteurs qui paraissent jouer un rôle dans ces divers aspects. Enfin nous conclurons.

A. — LE COMPORTEMENT DE LA NICOTINE DANS L'ÉPIDERME DES FEUILLES

Nous étudierons les différents aspects qu'offre la nicotine soit dans les cellules épidermiques banales, soit dans les stomates et leurs annexes, soit dans les poils, qu'ils appartiennent à l'une ou l'autre face de la feuille.

a. — CELLULES ÉPIDERMIQUES.

Premier type.



Fig. 11.

Les précipités obtenus sont finement granuleux, peu denses, et remplissent complètement le volume de la vacuole unique; leur aspect est analogue à celui que nous avons décrit dans les cellules internes de la plante; on le constate surtout dans les cellules épidermiques des feuilles jeunes (fig. 11).

Deuxième type.

La teneur en nicotine est plus grande que dans les cellules du type précédent; les précipités granuleux y sont plus denses

et confluent en certains points, disséminés irrégulièrement dans la cellule ; ils donnent à l'ensemble de la coloration une teinte plus foncée (fig. 12).

Troisième type.

L'ensemble de la coloration est encore plus prononcé, surtout en certains points ; les précipités sont devenus encore plus denses, et les points de confluence du type précédent prennent une coloration brun-acajou foncé, d'aspect homogène. Tout se passe comme si les précipités avaient fusionné entre eux pour constituer les petites masses brunâtres, qui présentent des contours très découpés par des précipités granuleux, en voie de fusion (fig. 13). Une partie de la cellule peut néanmoins conserver les aspects déjà décrits.



Fig. 12.



Fig. 13.

Quatrième type.

Une quatrième sorte d'image est particulièrement remarquable et a retenu notre attention.



Fig. 14.

Certaines masses de couleur brun noirâtre ont traversé le cytoplasme pariétal et la membrane cellulosique et se présentent à l'extérieur de l'épiderme sous forme de fines gouttelettes groupées ou séparées ; on peut assister parfois à la fusion des fines gouttelettes qui se soudent pour former une gouttelette plus volumineuse. On constate donc ainsi une véritable exsudation de la nicotine à l'extérieur de la plante (fig. 14).

Corrélativement, la teneur alcaloïdale dans la cellule a considérablement diminué ; les précipités qui existent encore à l'intérieur sont groupés au niveau du produit de l'exsudation. L'intérieur de la cellule peut ainsi présenter

soit une seule région de précipités granuleux, soit plusieurs régions de volume inégal, mais toujours avec une coloration plus marquée au niveau de l'exsudat.

Si l'on procède à des coupes transversales assez épaisses, cette opération est surtout possible au niveau des nervures assez consistantes, et où les mêmes phénomènes ont lieu; on obtient des aspects comparables à ceux que nous venons de décrire, mais où le processus de l'exsudation ne peut pas être suivi avec la même netteté.

Certaines cellules épidermiques sont dépourvues d'alcaloïde, mais ceci sous certaines conditions, que nous exposerons plus loin; dans ce cas, l'assise sous-épidermique est très riche en principe actif.

Lorsque la teneur alcaloïdale augmente dans la cellule épidermique, on voit que la coloration est toujours plus



Fig. 15.

intense vers la membrane externe; dans d'autres cas, on aperçoit que seule cette région externe donne une réaction positive; enfin, dans certains autres élé-

ments, la coloration brun homogène diminue graduellement et, vers le bas, les précipités sont seulement granuleux.

On assiste enfin, dans certains autres éléments, à la formation des exsudats externes décrits dans ce quatrième type, et les gouttelettes sont alors vues très nettement de profil (fig. 15). Pour constater ce dernier aspect, il faut procéder aux coupes avec le plus grand soin, sans mettre la feuille en contact avec les doigts, ou avec tout autre objet.

b. — STOMATES ET CELLULES ANNEXES.

Les divers aspects que l'on peut mettre en évidence dans les stomates et leurs cellules annexes, considérés *individuellement*, sont comparables à ceux que nous avons décrits pour les cellules épidermiques.

Il existe toutefois une différence que l'on peut constater dans l'ensemble de la coloration. Dans un lambeau d'épiderme,

la coloration étant bien marquée dans les cellules stomatiques, elle paraît beaucoup plus faible dans les cellules annexes; la description de ces éléments présente donc à ce titre un certain intérêt.

Premier type.

Les cellules stomatiques et leurs annexes contiennent très peu d'alcaloïde, et les précipités mis en évidence sont finement granuleux (cet aspect est surtout visible dans les jeunes épidermes).

Deuxième type.

1. — Cellules annexes.

La teneur alcaloïdale augmente, principalement sur les bords en contact avec des cellules épidermiques riches en nicotine.

2. — Cellules stomatiques.

Elles présentent des précipités granuleux assez denses à l'intérieur des vacuoles, qui sont très petites dans ces organes, la majeure partie de la cellule étant occupée par le cytoplasme contenant de gros chloroplastes.

Troisième type.

1. — Cellules annexes.

La richesse en principe actif a augmenté; et il y a toujours accentuation de la réaction, soit sur les bords en contact avec la cellule épidermique, soit dans le voisinage de la cellule stomatique, toutes les deux riches en nicotine; mais cette répartition n'est pas générale dans toutes les cellules annexes qui entourent le stomate; elle est au contraire très souvent différente dans chacun des éléments, qui peuvent présenter des aspects décrits dans les deux types précédents.

2. — Cellules stomatiques.

Elles sont fortement colorées; les précipités y sont très denses; la réaction peut être différente dans chacun des

deux éléments qui forment le stomate et donner deux teintes de coloration plus ou moins accentuée.

Quatrième type.

1. — Cellules annexes.

L'aspect y est peu différent de celui décrit dans les types précédents.

2. — Cellules stomatiques.

Ces éléments apparaissent complètement noirs, de même que l'ostiole; on assiste ainsi à une exsudation qui, dans certains cas, peut être d'une intensité telle que les produits de l'exsudation débordent sur les cellules voisines et ne permettent pas de distinguer le contour des cellules stomatiques.



Fig. 16.

Il arrive très souvent que, dans ce cas, les cellules annexes voisines sont pauvres en alcaloïde au centre et colorées sur les bords en contact avec la cellule stomatique, mais ceci n'est pas absolu (fig. 16).

Les cellules annexes ne semblent pas présenter les aspects des types 3 et 4 décrits pour les cellules épidermiques; il ne paraît pas s'y former des exsudats; ces éléments nous semblent jouer le rôle d'un lieu de passage de l'alcaloïde qui n'y séjourne pas. Nous supposons que l'alcaloïde que nous y mettons en évidence proviendrait soit des cellules profondes, soit des cellules épidermiques voisines, et émigrerait ensuite rapidement dans les cellules stomatiques où il serait exsudé. La présence de précipités plus denses au niveau des cellules épidermiques, ou des cellules stomatiques riches en alcaloïde, semblerait en être une preuve, de même que la diminution de la teneur alcaloïdale dans les cellules annexes, lorsque l'exsudation dans les stomates est très forte.

Dans les cellules stomatiques, nous n'avons pas pu mettre en évidence la formation des masses brunâtres aux dépens des précipités granuleux, et ceci avant leur exsudation, comme nous avons pu le faire pour les cellules épidermiques, l'accumulation de la nicotine ne pouvant pas avoir lieu dans des vacuoles très petites, et la fusion des précipités granuleux devant y être très rapide et suivie immédiatement de l'exsudation; le processus de la formation de l'exsudat passe alors inaperçu (Voir à la fig. 10 différents aspects présentés par les stomates et leurs annexes).

c. — POILS.

Les images obtenues dans les poils après mise en évidence des alcaloïdes sont les plus intéressantes à observer, car ces éléments sont très transparents, et l'exsudation très abondante peut être aperçue de profil sur les bords de la membrane sans avoir recours aux coupes.

Premier type.

Certains poils sont *absolument* dépourvus d'alcaloïde; la solution iodée y colore en jaune clair les matières protéiques du cytoplasme, et les vacuoles se détachent assez bien; les diverses régions cytoplasmiques y sont nettement mises en évidence, surtout dans la cellule basale et celle qui lui fait suite. La coloration accusée par le cytoplasme ne peut être confondue avec celle des alcaloïdes, et ceci sans avoir recours à la différenciation de ces matières par leur inégale solubilité dans l'alcool tartrique (méthode d'ERRERA).

Ce sont de tels aspects que nous avons mis en évidence au début de nos recherches et qui nous avaient porté à croire que les poils étaient dépourvus d'alcaloïde.

Deuxième type.

La réaction de BOUCHARDAT accuse quelques précipités granuleux et peu denses dans la partie inférieure de la cellule

basale ; les autres cellules en sont dépourvues. On assiste ainsi au début de la migration de l'alcaloïde de la cellule épidermique vers l'intérieur du poil ; l'on peut, en effet, faire la constatation suivante très suggestive à cet égard : la partie inférieure de la cellule basale en contact avec l'épiderme est plus finement teintée en brun, sous une forme granuleuse assez dense, et la cellule épidermique est riche en précipités granuleux (fig. 17). (Cf. à la microphotographie n° 1 de la planche I).

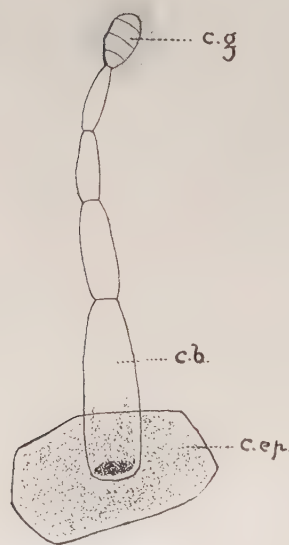


Fig. 17. — *cg*, cellule glandulaire ; *cb*, cellule basale ; *cep*, cellule épidermique.

leux y sont très denses.

La cellule basale du poil contient de la nicotine, qui se présente sous différents aspects ; à l'intérieur de la cellule, on peut voir de fins précipités granuleux. Sur les bords, en contact avec le cytoplasme pariétal, se trouvent de petites masses brunes aux contours très découpés et provenant de la fusion des précipités granuleux.

Au niveau de la membrane de séparation de la cellule basale et de celle qui lui fait suite, nous retrouvons une image analogue à celle que nous avons décrite entre l'épiderme et la cellule basale (coloration plus intense de

Troisième type.

La teneur alcaloïdale a augmenté dans la cellule épidermique sur laquelle est insérée le poil ; la membrane de séparation de ces deux éléments est plus fortement colorée que dans le type précédent et les précipités granuleux y sont très denses.



Fig. 18.

chaque côté de la membrane cellulosique de séparation). Les cellules suivantes sont moins riches en alcaloïde, et la nicotine présente des aspects identiques à ceux de la cellule basale (fig. 18).

Quatrième type.

Dans la cellule épidermique, la nicotine paraît être groupée tout autour du niveau d'insertion du poil; les bords de cet élément en sont dépourvus; la teneur alcaloïdale est dans son ensemble en très nette décroissance.

Dans le poil, la cellule basale est colorée en brun-acajou très foncé, et l'on aperçoit à l'extérieur des grosses masses de nicotine exsudée; ces gouttelettes fusionnées débordent à la base du poil et ne permettent pas de distinguer la membrane de séparation déjà décrite; la partie supérieure de cette cellule basale participe au phénomène avec moins d'intensité. Dans d'autres cas, il n'y a pas prédominance de l'exsudation à la base du poil, et c'est tout autour de cet élément que sont disséminées les gouttelettes d'exsudation, et les précipités granuleux sont généralement visibles à l'intérieur des vacuoles (fig. 19). (Cf. aux microphotographies 2 et 3 des planches I et II).



Fig. 19.

Les cellules suivantes participent, elles aussi, au même phénomène avec moins d'intensité; mais ici il arrive très fréquemment que l'exsudation ait lieu surtout au niveau de la membrane de séparation de deux cellules.

Dans quelques rares cas, nous avons constaté une production d'exsudats dans les cellules glandulaires; la coloration de ces gouttelettes produites dans cette région terminale se superpose à la coloration jaune des produits d'excrétion des cellules glandulaires et en demeure absolument distincte.

Les images que l'on obtient dans ce quatrième type sont

évidemment très variables au point de vue de l'intensité du phénomène et de la répartition des produits exsudés ; mais, dans tous les cas, l'exsudation est accompagnée d'une diminution très notable d'alcaloïde dans la cellule épidermique, où ce produit est réuni autour du poil ; cette diminution peut aller, même dans le cas d'une forte exsudation, à la disparition presque totale du principe actif dans cet élément.

Cinquième type.

L'exsudation paraît être terminée : la cellule épidermique demeure pauvre en alcaloïde, lequel reste groupé autour du poil ; celui-ci présente une teneur alcaloïdale et un aspect général analogue à ceux que nous avons décrits dans le deuxième type, mais il s'en différencie dans certains cas par la présence des masses brunâtres sur les bords du poil correspondant à une partie de l'alcaloïde non exsudé ; les régions de séparation des cellules présentent encore une réaction alcaloïdale (fig. 20).

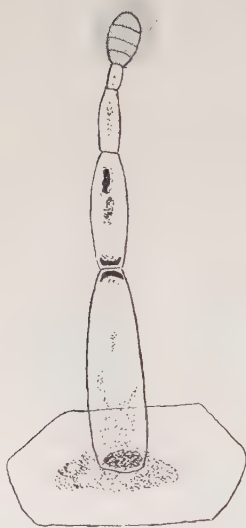


Fig. 20.

B. — LE COMPORTEMENT DE LA NICOTINE DANS D'AUTRES PARTIES DE LA PLANTE.

Nous avons étudié d'une manière analogue à celle que nous venons d'exposer pour les épidermes des feuilles les régions externes des autres parties de la plante, et nous avons pu constater que le phénomène existait dans toutes les parties aériennes avec plus ou moins d'intensité.

La difficulté de détacher les épidermes dans les feuilles du bourgeon et dans les divers verticilles de la fleur, et la nécessité de procéder à des coupes dans des organes extrêmement fragiles, comme le sont en particulier les pièces de la corolle, rendent les résultats moins nets ; dans ces derniers organes, on peut procéder à un examen direct avec réaction, et l'on

constate que le phénomène est principalement bien marqué peu avant le flétrissement des pétales.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus sont comparables à ceux que nous avons décrits dans les épidermes des feuilles.

Nous nous sommes aussi efforcés de mettre en évidence le phénomène d'exsudation dans l'enveloppe de l'ovule. Pendant la formation de cet organe, la réaction de BOUCHARDAT montre la présence de nicotine à l'état de précipités granuleux dans les petites vacuoles à aspect réticulé ; après la fécondation, le tégument externe se remplit d'amidon et gêne la visibilité de la réaction.

Toutefois, dans quelques *rare cas*, nous avons pu constater nettement la formation de gouttelettes d'exsudation, sans pouvoir suivre le processus de leur formation, comme cela est possible dans les poils et les épidermes des feuilles.

Si le phénomène d'exsudation est général, dans cet épiderme ainsi que nous le pensons, il permettrait d'expliquer l'absence de nicotine dans la graine et sa présence *possible*, mais non certaine, dans les débris de cette assise, où la membrane externe se désorganise. La nicotine proviendrait soit d'une exsudation non complètement terminée, soit des précipités granuleux non exsudés et mélangés à des impuretés et à des débris de membrane.

L'assise subéreuse ou les dernières assises du liège de la racine doivent aussi présenter ce phénomène ; mais nous n'avons pas pu le mettre en évidence ; nous pensons que la nicotine, au fur et à mesure qu'elle est exsudée, doit être dissoute dans l'eau du milieu de culture. Nous avons essayé de recueillir cette eau aux fins d'analyse ; cette opération n'est possible, en principe, que pour les plantules, où l'exsudation doit être très faible. Les divers milieux de culture des plantules se prêtent mal à cette opération ; il faut y renoncer pour les plantules poussées dans la terre ; sur celles qui se sont développées sur du papier buvard humide, la réaction est également impossible sur ce dernier substratum.

Nous avons alors tenté de cultiver des graines de Tabac sur du sable siliceux de Fontainebleau préalablement stérilisé ; mais les graines n'ont pas germé ; les essais de cul-

ture effectués sur de la pierre ponce n'ont donné de même aucun résultat. Nous avons pensé ainsi pouvoir laver le substratum et recueillir un liquide susceptible de contenir de l'alcaloïde à l'état de solution, ainsi qu'ont opéré certains auteurs dans d'autres plantes alcaloïfères, mais possédant des graines beaucoup plus volumineuses que celles du Tabac.

Quant aux cultures pures de Tabac réalisées par GUILLIERMOND, DUFRÉNOY et LABROUSSE, le milieu solide gélosé ne pouvait évidemment se prêter à aucune réaction alcaloïdale.

II. — VARIATIONS DU PHÉNOMÈNE

La présence de l'exsudation et son intensité varient suivant certains facteurs.

Au point de vue histochimique, ces variations ne peuvent être évaluées que qualitativement, et demeurent par ce fait même éminemment subjectives, comme l'ont été d'ailleurs les appréciations sur les différences de teneur alcaloïdale dans les cellules internes de la plante.

Seules des expériences physiologiques que nous exposerons plus loin pourront faire connaître d'une façon précise ces variations; mais, de même que l'analyse chimique nous renseigne seulement sur le taux alcaloïdal total pour la plante entière, les exsudats que l'on pourra éventuellement recueillir intéresseront toute la plante sans pouvoir nous faire préciser les variations propres à chacun des organes ou des régions de ces organes.

D'autre part, les conditions spéciales de vie auxquelles on sera obligé de soumettre la plante pour recueillir les gouttelettes d'exsudation pourront amener des perturbations dans la production de celles-ci.

De ce court aperçu, nous pouvons déduire que, quoique très imparfaites, les données apportées par l'observation histochimique demeurent indispensables et pourront seules nous renseigner au point de vue biologique avec le plus de précision.

Un des buts que nous avons poursuivis dans notre étude, et

que nous croyons avoir réalisé, était de donner une explication de la perte de nicotine, constatée par les chimistes dans la plante de Tabac; le comportement des épidermes que nous avons longuement exposé explique cette perte de principe actif.

Les variations dans l'intensité du phénomène, telles que nous les avons observées, ne sont que des variations globales; nous n'avons pas étudié tous les détails de ce phénomène, et nos observations ne constituent que les bases d'une étude ultérieure. Les facteurs qui influent sur cette exsudation sont en effet multiples, de telle sorte qu'il est difficile d'en considérer un seul isolément en faisant abstraction des autres, et de préciser d'une manière absolue l'influence certaine d'un facteur déterminé.

Les facteurs qui jouent un rôle dans les variations de la production du phénomène d'exsudation forment deux groupes :

Premier groupe. — Influence des conditions extrinsèques (milieu).

Deuxième groupe. — Influence des conditions intrinsèques (organe examiné, région de cet organe, cellules qui entrent en jeu dans la production du phénomène).

A. — INFLUENCE DES CONDITIONS EXTRINSÈQUES

Les faits que nous allons relater prouvent que l'exsudation de l'alcaloïde dépend des conditions réalisées dans le milieu extérieur; il eût été très intéressant d'analyser avec précision, par la mesure de la température, de l'état hygrométrique, de l'insolation, etc., les divers états du milieu. Travaillant le plus souvent avec des moyens de fortune, il ne nous a pas été encore possible de procéder à cette analyse; nous ne ferons donc ici qu'indiquer les variations évidentes que présente dans trois stations écologiquement très différentes l'exsudation nicotinique.

Ces trois stations sont :

a. Les champs d'expérience des Manufactures de l'État à Pont-de-Beauvoisin (Isère);

b. Le jardin du Laboratoire de biologie végétale de Fontainebleau ;

c. Le jardin de l'annexe P. C. N. de la Faculté des Sciences de Paris.

a. — L'EXSUDATION DANS LES CHAMPS D'EXPÉRIENCE
DE PONT-DE-BEAUVOISIN.

Les champs d'expérience de Pont-de-Beauvoisin sont situés sur un plateau, éloignés de toute agglomération et de toute voie ferrée, largement découverts, dépourvus d'arbres, donc librement exposés au soleil ; le terrain de culture est très bien entretenu et présente donc les conditions optimums. Ces plantes, que nous avons étudiées, avaient été presque toutes écimées, suivant les règles imposées par l'administration. Nos observations ont été poursuivies dans cette station du 2 au 26 août 1928, période qui fut chaude et sèche (un seul jour de pluie).

Les Tabacs étudiés dans ces conditions offraient une exsudation *extrêmement intense* ; ce sont à ces aspects que se rapportent les descriptions précédentes, destinées à donner l'idée la meilleure du phénomène lorsqu'il se produit avec le maximum d'intensité.

L'exsudation varie d'ailleurs suivant les diverses heures de la journée. Des feuilles prélevées à 6 heures du matin et étudiées une demi-heure après présentent des précipités granuleux à l'intérieur des cellules épidermiques banales, ainsi que dans les cellules basales du poil (type 2) ; certains de ces éléments sont complètement dépourvus de principe actif (type 1) ; un dernier groupe présente l'aspect du type 5, c'est-à-dire que les gouttelettes extérieures correspondent à une fin d'exsudation et sont situées aussi bien dans les cellules terminales que dans les cellules basales. A l'intérieur des cellules du poil, se trouvent quelques précipités granuleux réunis au niveau de la gouttelette d'exsudation.

Les prélèvements effectués entre 8 heures et 10 heures présentent les aspects-types que nous avons déjà décrits. De 12 heures à 15 heures, le phénomène se poursuit dans des

conditions semblables, mais qui paraissent être encore plus marquées.

C'est à ce moment de la journée, et surtout vers midi, que les parties des organes dans lesquelles l'exsudation est maximum (Cf. p. 53 et 59) dégagent le plus de nicotine, notamment à la surface de l'épiderme supérieur des feuilles. On observe alors d'énormes gouttes alcaloïdales; la base des poils est empâtée; l'ostiole des stomates masqué; tout l'épiderme en général maculé de dépôts fluides que brunit le réactif iodé et qui fusent de tous les côtés sous la pression de la lamelle.

Vers 16 heures, l'exsudation paraît déjà moins active; elle diminue nettement vers 18 heures, mais certains éléments sont encore en activité, *surtout les poils*; il semble que la migration des alcaloïdes soit plus ralentie.

Nous pensons que, pendant les heures chaudes de la journée, la migration et l'exsudation des alcaloïdes se poursuit sans interruption dans tous les éléments; vers le soir, seuls les poils restent actifs, et les gouttelettes que l'on peut retrouver le matin proviennent d'une exsudation non terminée la veille.

Ces données n'ont rien d'absolu, et il est difficile de les fixer d'une façon certaine en ayant recours aux seuls examens microchimiques.

Nous avons essayé d'étudier d'une manière plus précise l'influence de l'exposition au soleil. A cet effet, nous avons prélevé à 6 heures du matin des feuilles à peu près semblables; un lot demeurait à l'ombre à l'intérieur de notre laboratoire; un autre lot était exposé aux rayons solaires; chaque feuille plongeait par son pétiole dans un cristalliseur contenant de l'eau. En prélevant des fragments d'épiderme à 7 heures et à 8 heures, nous avons toujours constaté que les feuilles demeurées au soleil présentaient une exsudation beaucoup plus intense que celles qui étaient restées à l'ombre. Cette expérience ne peut pas être poursuivie longtemps, car, vers 9 heures, les feuilles mises au soleil sont flétries; l'épiderme ne peut plus y être détaché; les réactions que l'on obtient s'adressent à des éléments morts et sont d'une interprétation difficile.

b. — L'EXSUDATION DANS LE JARDIN DU LABORATOIRE
DE BIOLOGIE VÉGÉTALE A FONTAINEBLEAU.

Le jardin de Fontainebleau est situé à l'orée de la forêt; limité par des grands arbres, il est incomparablement moins ensoleillé que les champs de Pont-de-Beauvoisin; le sol n'y est pas, comme dans cette dernière station, spécialement préparé pour la culture du Tabac. La proximité de la voie ferrée est responsable de la présence à la surface des feuilles d'abondants dépôts charbonneux; les plantes que nous avons étudiées n'avaient point été écimées. Nos observations ont été poursuivies dans cette station du 4 au 27 août 1929, période qui fut chaude avec quelques jours de pluie; mais le terrain d'expérience était très fréquemment arrosé. Ce milieu était donc, dans l'ensemble, beaucoup plus humide et sans doute moins éclairé que celui de Pont-de-Beauvoisin.

Les examens des fragments d'épiderme ont révélé que, d'une manière générale, l'exsudation était très nettement moins intense qu'à Pont-de-Beauvoisin. Dans certains cas même, on a constaté que seules les cellules épidermiques servant de base au poil et la cellule basale du poil contenaient de la nicotine sous l'aspect granuleux dense. La teneur alcaloïdale des cellules voisines était progressivement moins grande en s'éloignant de ces éléments, et le phénomène d'exsudation ne se produisait pas.

Si, dans de tels objets, l'on procédait à une coupe, soit dans la tige, soit dans la feuille, on apercevait que, en général, la plus grande teneur en nicotine était obtenue: pour la tige, dans l'assise sous-épidermique; pour la feuille (régions des nervures), dans les premières assises du collenchyme, pour le mésophylle, la présence des chloroplastes rendait toute appréciation fort délicate.

Nous avons étudié également, à Fontainebleau, des plantes de Tabac placées sous une cloche traversée par un courant d'air entretenu par l'aspiration d'une trompe à eau. Par suite de la transpiration de la plante, l'atmosphère de la cloche ne tarde pas à se saturer d'humidité, et les prélèvements

des feuilles effectués alors n'ont pas permis, dans l'ensemble, de constater une appréciable exsudation ; la disposition de la nicotine dans les cellules épidermiques et sous-épidermiques était la même que dans les cas relatés plus haut (nicotine à l'état granuleux, surtout abondante dans la cellule basale des poils et dans les cellules sous-épidermiques).

c. — L'EXSUDATION A PARIS (*Jardin de l'annexe P. C. N de la Sorbonne*).

Ce jardin est exposé à l'est-nord-est, à l'ombre de bâtiments élevés. Le sol rocailleux est mal entretenu. Les plantes étudiées n'avaient pas été écimées et étaient montées en graines. Nos observations ont été faites en effet du 25 septembre au 10 octobre (environ), pendant trois années consécutives (1928-1929-1930).

Le phénomène d'exsudation est dans ces conditions *extrêmement réduit* ; quelques poils de la face supérieure des feuilles présentent toutefois de petites gouttes d'exsudation, sans que celles-ci confluent jamais jusqu'à former des empâtements comparables à ceux observés à Pont-de-Beauvoisin, ou même, dans certains cas, à Fontainebleau.

B. — INFLUENCE DES CONDITIONS INTRINSÈQUES

a. — LE PHÉNOMÈNE EST D'AUTANT PLUS INTENSE
QUE LES ORGANES SONT PLUS DÉVELOPPÉS.

Les feuilles du bas de la plante, qui sont les plus âgées et les plus développées, sont les organes où l'exsudation est le plus grande ; le maximum semble être atteint dans les plantes écimées, lorsque la feuille est considérée comme « mûre » au point de vue de son utilisation industrielle, c'est-à-dire lorsque apparaissent à la surface des marbrures jaunâtres et qu'elle se casse nettement lorsqu'on la plie.

Les feuilles du haut en voie de croissance et bien étalées (feuilles de la couronne) sont aussi le siège d'une activité exsudative bien prononcée.

Dans les jeunes feuilles constituant le bourgeon, l'exsudation semble être exceptionnelle dans les cellules épidermiques, et dans les stomates; mais elle peut se produire par les poils où nous avons vu, dans certains cas, des images analogues, à celles obtenues dans les poils des feuilles âgées; toutefois, l'on peut considérer ce fait comme rare. L'épiderme et les stomates ne contiennent que des précipités granuleux à l'intérieur de leurs vacuoles; il est d'ailleurs assez difficile de prélever des épidermes dans ces jeunes organes.

b. — DANS LA FEUILLE, L'EXSUDATION EST PLUS INTENSE SUR LA FACE SUPÉRIEURE QUE SUR LA FACE INFÉRIEURE.

Dans l'ensemble, il existe une différence très nette entre les deux épidermes; dans nos essais de localisation, nous avons déjà constaté que le parenchyme palissadique était plus riche en alcaloïde que le parenchyme lacuneux; il en est de même pour les épidermes surmontant ces deux régions du mésophylle.

Si, à un moment donné, on examine des fragments d'épiderme provenant de chacune des faces et situés dans la même région topographique, on constate, par exemple, que, dans l'épiderme supérieur, tous les éléments anatomiques (cellules épidermiques, stomates, poils) participent avec intensité à l'exsudation; dans l'épiderme inférieur, seuls les poils sont en activité. L'épiderme de la face inférieure est toujours en retard par rapport à la face supérieure pour l'intensité de l'exsudation.

Cette différence est surtout très nette le matin, alors que vers le milieu de la journée, lorsque le phénomène est intense, il est difficile de la mettre en évidence.

c. — DANS UN ÉPIDERME DÉTERMINÉ, L'EXSUDATION EST PLUS GRANDE A L'EXTRÉMITÉ DES NERVURES.

Ce caractère est un de ceux que nous avons mis en évidence avec la plus grande netteté. Dans la région épidermique recouvrant l'extrémité des nervures, et dans la région de

ramification de deux ou plusieurs nervures, les poils sont plus denses, surtout à la face supérieure, et présentent une activité beaucoup plus grande dans la production des gouttelettes d'exsudation que les poils situés sur le mésophylle. Il en est de même des cellules épidermiques qui surmontent les terminaisons ou les ramifications des fines nervures.

Cette activité va en décroissant dans les régions situées au-dessus des nervures plus volumineuses (tissu surmontant la nervure principale), surtout vers le bas de celle-ci, où elle est très nettement inférieure, et c'est de toute la feuille la région la moins active. Nous supposons que les assises sous-jacentes de cette région, constituées par des cellules de collenchyme assez épaisses, doivent être un obstacle à la migration des alcaloïdes. Les cellules entourant le tissu criblé de la nervure principale, surtout à la face supérieure, sont pourtant riches en principe actif; la migration se ferait donc dans cette région par l'intermédiaire du tissu parenchymateux du mésophylle voisin.

Il existe enfin une différence peu nette entre le haut de la feuille, qui paraît être plus actif que le bas; de même, la région marginale semble présenter une intensité d'exsudation plus grande que la région centrale.

d. — L'ACTIVITÉ SÉCRÉTICE SE MANIFESTE D'ABORD DANS LES POILS, ENSUITE DANS LES STOMATES ET ENFIN DANS LES CELLULES ÉPIDERMIQUES BANALES.

Dans un épiderme déterminé, où les phénomènes de migration et d'exsudation des alcaloïdes commencent à se produire, ce sont les poils qui accusent les premiers la réaction d'exsudation; dans certains organes (jeunes feuilles des bourgeons), ce sont à ces éléments seuls que semble dévolu le rôle de rejeter la nicotine à l'extérieur; c'est ensuite à l'extérieur de la membrane des stomates que les gouttelettes apparaissent; enfin l'épiderme entre en jeu, et ce dernier élément n'est surtout actif qu'à la face supérieure de la feuille.

Les cellules annexes, ainsi que nous l'avons vu, ne paraissent

jouer généralement aucun rôle dans l'exsudation, mais être seulement des lieux de passage de l'alcaloïde.

Ces faits sont à rapprocher de ceux que nous avons signalés plus haut, au cours de l'étude de l'influence des agents extrinsèques : à Pont-de-Beauvoisin, où l'exsudation nicotinique s'est présentée à nous avec le maximum d'intensité, les cellules basales des poils fonctionnent les premières et sont toujours recouvertes d'une plus grande quantité d'alcaloïdes que les autres éléments; à Fontainebleau, où l'exsudation est plus faible, le phénomène n'est très net qu'au niveau des cellules basales des poils, peu marqué au niveau des cellules épidermiques; à Paris enfin, où l'exsudation est minimum, le phénomène n'existe que dans les cellules basales des poils.

Ces distinctions, qu'il s'agisse des conditions extrinsèques ou intrinsèques, ne sont, il importe de le souligner avec force, que des *moyennes*; il peut arriver que, dans une région déterminée d'un épiderme, un poil soit dépourvu d'exsudation, alors que les cellules épidermiques voisines sont surchargées d'alcaloïde : c'est que toute la nicotine du poil a été volatilisée, et le phénomène qui s'est produit plus tard dans les cellules épidermiques banales n'est pas encore achevé.

La même remarque vaut pour la comparaison entre les épidermes inférieur et supérieur, entre les régions d'un même épiderme, ou entre les plantes provenant de régions différentes. Il n'en est pas moins exact que nos remarques présentent une valeur générale.

III. — NATURE DES PRODUITS EXSUDÉS

Nous avons, jusqu'à présent, implicitement admis que les exsudats révélés par l'examen microscopique étaient de nature alcaloïdale; il importe maintenant de donner des arguments en faveur de cette affirmation.

Les arguments que nous allons exposer sont de deux sortes :

1^o Arguments histochimiques basés sur un examen direct de la plante en voie d'exsudation, et qui forment une série de déductions nous amenant à conclure sur la nature du produit rejeté, sans toutefois nous apporter de preuves absolues ;

2° Arguments basés sur des expériences qui sont susceptibles de nous renseigner sur la nature exacte de l'exsudation.

A. — ARGUMENTS HISTOCHIMIQUES

Ces arguments sont basés sur quatre ordres de considérations différentes :

1° Si l'on veut bien se reporter aux constatations que nous avons faites et décrites dans la première partie de ce chapitre, on verra que, dans tous les éléments signalés comme étant le siège d'une exsudation, l'intensité du phénomène (mise en évidence par le réactif iodé) est en raison inverse de l'intensité de la réaction obtenue à l'intérieur des cellules qui entrent en jeu, cette appréciation demeurant malgré tout subjective, comme l'ont été celles que nous avons faites lors de nos essais de localisation.

Le rappel de quelques exemples sera très suggestif :

a. Dans les cellules banales de l'épiderme, nous avons vu que, lorsque la face externe des cellules était dépourvue de gouttelettes, l'intérieur de la cellule contenait des précipités granuleux plus ou moins denses. Quand l'exsudation se produit, nous voyons, à l'intérieur de la cellule, les précipités alcaloïdaux venir se grouper au niveau du produit rejeté, formant ainsi autant de masses qu'il y a de gouttelettes exsudées; lorsque le phénomène touche à la fin, la quantité de nicotine à l'intérieur de la cellule est extrêmement faible. Autre exemple : lorsque, par suite de conditions extrinsèques, l'exsudation ne se produit pas du tout et que la cellule épidermique est pauvre en alcaloïdes, nous trouvons une accumulation de ceux-ci dans l'assise sous-jacente ;

b. Dans les cellules stomatiques et leurs annexes, on constate que c'est au moment où les éléments stomatiques sont le plus intensément brunis sous l'influence d'I³K, par suite d'une exsudation intense, que les cellules annexes présentent le moins de précipités granuleux, et ceux qui existent se groupent au niveau de la membrane en contact avec le stomate ;

c. Nous retrouvons les mêmes relations dans les poils,

relations qui intéressent non seulement les gouttelettes rejetées au niveau du poil et le contenu alcaloïdal des cellules qui le composent, mais aussi l'intensité de la précipitation dans la cellule épidermique d'insertion.

Alors que, dans certains cas, les cellules supérieures du poil sont dépourvues de nicotine, la cellule épidermique basale en contient beaucoup, quand bien même tous les éléments voisins n'en renferment pas (cas d'une exsudation faible). Lorsque, au contraire, le phénomène se produit avec intensité et que toute la surface du poil y contribue, la teneur alcaloïdale baisse dans la cellule épidermique basale; les précipités viennent se grouper au niveau de la membrane de séparation avec le poil, et la périphérie en est dépourvue.

Si l'on examine certains poils le matin, on peut voir quelques gouttelettes externes provenant d'une évaporation non terminée, et à ce niveau, à l'intérieur de la cellule, des précipités granuleux, alors que partout ailleurs la réaction est négative à l'intérieur des cellules du poil.

En résumé, toutes les fois que l'exsudation est maximum, la teneur alcaloïdale est minimum à l'intérieur des cellules.

Nous avons, bien entendu, pris comme exemple des types tranchés d'exsudation; mais tous les termes de passage peuvent se présenter dans un même fragment d'épiderme.

2^o Nous savons comment la méthode d'ERRERA permet d'établir une distinction très nette entre les matières albuminoïdes et les alcaloïdes, ces deux sortes de corps présentant une inégale solubilité dans l'alcool tartrique, les protéines y étant précipitées, alors que les alcaloïdes y sont dissous. Nous appliquons cette méthode pour montrer l'identité des produits rejetés et des alcaloïdes contenus dans les cellules.

Lorsqu'une feuille ou un fragment d'épiderme présente une grande intensité du phénomène, une partie de cet épiderme est traitée par l'alcool tartrique, c'est-à-dire plongée pendant une heure dans la solution que l'on renouvelle à différentes reprises; elle est ensuite soigneusement lavée et examinée à l'aide du réactif iodé; on constate que les gouttelettes exsudées ont disparu, comme l'a fait l'alcaloïde contenu à l'intérieur des cellules.

3° L'exsudation ne peut pas être un produit de nature voisine des cires, des essences ou des gommes que l'on trouve assez souvent à la surface de certaines plantes, car les divers réactifs de ces corps (acide osmique, rouge-soudan, bleu d'indophénol, pour les cires et les essences, rouge de ruthénium pour les gommes) n'ont *aucune action* sur les exsudats, alors que le rouge-soudan et l'acide osmique colorent l'excrétion produite par les poils glandulaires du Tabac, excrétion qui paraît donc être constituée par des essences ou des résines. L'excrétion de ces corps n'a d'ailleurs aucune relation avec le phénomène d'exsudation proprement dit, et très souvent le poil glandulaire excrète des oléo-résines, alors que l'exsudation de nicotine est nulle dans toutes les cellules ; dans d'autres cas, au contraire, les deux phénomènes ont lieu simultanément.

4° L'on sait que, lorsque l'exsudation est très intense pendant le jour, on peut retrouver le matin, à la surface de certains poils, des gouttelettes non évaporées ; si les conditions extérieures permettent en même temps la formation de rosée à la surface de la plante, on peut alors procéder à l'expérience suivante : on prélève avec une fine pipette quelques gouttes de rosée sur la face supérieure des feuilles, ou encore on applique la lame porte-objet sur les gouttes d'eau qui perlent à la surface de la feuille ; en mettant en contact cette eau avec une goutte du réactif de BOUCHARDAT, on voit *se produire un trouble identique à celui obtenu avec une solution très diluée de nicotine pure*, trouble qui ne tarde pas à disparaître. La solution saturée d'acide picrique accuse aussi la réaction alcaloïdale.

Il y a donc là un argument précieux en faveur de la nature alcaloïdale de l'exsudation ; mais, alors que nous avons obtenu des résultats très nets sur des plantes de la station de Pont-de-Beauvoisin, des essais identiques que nous avons faits sur les feuilles de Tabac du jardin botanique de Fontainebleau ont été bien moins probants. La réussite de cette expérience dépend, en effet, surtout de l'intensité du phénomène au cours de la journée.

Nous avons aussi essayé, à Fontainebleau, de laver la sur-

face des feuilles avec de l'eau légèrement acidulée par HCl; le liquide que nous recueillons ainsi était troublé par des particules charbonneuses et autres poussières de l'atmosphère; les réactions alcaloïdales n'ont alors donné aucun résultat.

De ces quatre ordres d'arguments, l'on peut déduire que: l'exsudat est en rapport évident avec la substance formée à l'intérieur des cellules, substance qui présente les caractères de la nicotine; ces gouttes exsudées se dissolvent comme les alcaloïdes dans l'alcool tartrique; elles sont également dissoutes dans l'eau pure de la rosée, qui présente dès lors les réactions des solutions alcaloïdales; enfin le produit exsudé ne présente rien de commun avec ceux que l'on a coutume de trouver à la surface des feuilles (cires, gommes, essences, etc.).

B. — ARGUMENTS D'ORDRE EXPÉRIMENTAL

L'idée directrice qui nous a conduit dans cet ordre de recherches était de recueillir l'air ayant séjourné au voisinage de la plante de Tabac en voie d'exsudation, c'est-à-dire chargé de vapeurs de nicotine, de faire barboter cet air dans un liquide approprié qui puisse dissoudre ces vapeurs et de les caractériser ensuite chimiquement.

Nos essais furent renouvelés pendant trois années consécutives. Les premiers furent infructueux, et la technique que nous avons mise au point (technique susceptible d'amélioration) fut précédée de beaucoup de tâtonnements.

Nos premiers essais ont porté sur une plante de Tabac cultivée en plein champ au jardin du Laboratoire de biologie végétale à Fontainebleau; la plante était arrivée à son plein développement (1^m,10 de hauteur), c'est-à-dire présentait, au point de vue histochimique, le maximum du phénomène d'exsudation; il nous fut impossible de nous procurer une cloche de dimensions suffisantes pour recouvrir cette plante. Nous eûmes alors recours à une cage vitrée, mais celle-ci ne fut pas assez étanche pour permettre une circulation d'air à l'aide d'une trompe à eau; d'autre part, une transpiration extrêmement abondante ne tardait pas à saturer l'air

ambiant et à empêcher la production du phénomène. Nous avons alors essayé d'absorber cet excès d'humidité en mettant sous la cage de grands cristallisoirs, contenant soit SO^4H^2 , soit du chlorure de calcium. La présence de ces corps, cependant avides d'eau, fut malgré tout insuffisante pour dessécher l'air.

Nous avons aussi supposé, au début de nos recherches, que l'eau d'évaporation produite au début de l'exsudation pouvait dissoudre l'alcaloïde rejeté de la plante. Nous avons donc tenté de recueillir directement cette eau et d'y effectuer les réactions alcaloïdales; nous procédions ainsi à une expérience analogue à celles de CIAMICIAN et RAVENNA, qui, ayant inoculé du tartrate de nicotine à des plantes de Maïs, introduisent les feuilles dans un ballon renversé et incliné, dont les parois avaient été humectées avec une solution très diluée d'acide sulfurique, et retrouvent le liquide injecté dans l'acide sulfurique du ballon.

N'ayant pas pu réaliser un dispositif pour recouvrir une seule feuille de Tabac (feuille engainante), nous avons pris une jeune plante de Tabac (20 centimètres de hauteur); le pot la contenant était renversé sur une cloche dont les bords étaient soigneusement lutés sur un plaque de verre; l'eau d'évaporation se concentrait alors dans le fond de la cloche; cette eau, traitée ensuite par les réactifs généraux des alcaloïdes, ne présentait aucune réaction de ces corps. Ces résultats étaient analogues à ceux des deux auteurs italiens qui, ayant inoculé du tartrate de nicotine à la plante de Tabac, ne trouvaient plus cette base dans l'eau d'évaporation, comme ils avaient pu le faire avec la plante de Maïs.

Une troisième série d'essais fut faite sur un semis de Tabac placé sous une cloche à tubulure, où le renouvellement d'air était assuré par une trompe à eau; à sa sortie, l'air barbotait dans une solution étendue d' HCl (dissolvant énergique de la nicotine); l'appareil était placé dans une serre à chauffage électrique, à une température de 25° environ; après fonctionnement du dispositif pendant quatre jours, l'eau du barboteur était prélevée, et, après réaction avec quelques gouttes d'acide silico-tungstique, on obtenait un très léger louche;

mais la réaction était insuffisante pour être concluante.

Ces divers insuccès nous démontrèrent donc :

1° L'impossibilité de réaliser notre expérience en plein champ et sur une grande plante ;

2° La possibilité d'opérer sur des plantes plus petites ou sur des semis de Tabac, où l'exsudation, quoique faible, peut exister ; le résultat obtenu dans notre troisième série d'essais était assez encourageant (il nous avait été impossible de prélever sur les plantes de semis des épidermes pour mettre nettement en évidence les réactions microchimiques de l'exsudation) ;

3° La nécessité d'effectuer directement la réaction alcaloïdale dans les barboteurs au fur et à mesure du passage de l'air ayant séjourné autour de la plante, et ceci sans avoir recours au préalable à un dissolvant des alcaloïdes ;

4° L'obligation de réunir sous la cloche les conditions extrinsèques optima pour la production du phénomène, c'est-à-dire la production d'un air sec et chaud, et aussi d'éviter par un dispositif approprié la formation de l'eau de condensation sur les parois.

Nous avons donc réalisé l'appareillage suivant, qui nous a permis de recueillir les exsudats et de les caractériser ; il est composé d'une série d'instruments reliés entre eux par des tubes de caoutchouc, et dans lesquels la circulation d'air est assurée par une trompe à eau (fig. 21).

1° L'air pénètre dans un compteur à gaz (Cg) destiné à mesurer la quantité d'air circulant dans l'ensemble du dispositif ; cette circulation s'établit à 500 litres environ par vingt-quatre heures, pour une cloche de 10 litres de capacité. La circulation devra être augmentée pour des cloches de plus grand volume, mais il est difficile de dépasser 700 litres à cause du bouillonnement trop intense qui se produit alors dans les barboteurs disposés à la suite.

2° Un barboteur (B_1) contenant SO^4H^2 pur est destiné à débarrasser l'air de la vapeur d'eau et des vapeurs basiques qu'il peut contenir (SO^4H^2 est renouvelé toutes les douze heures).

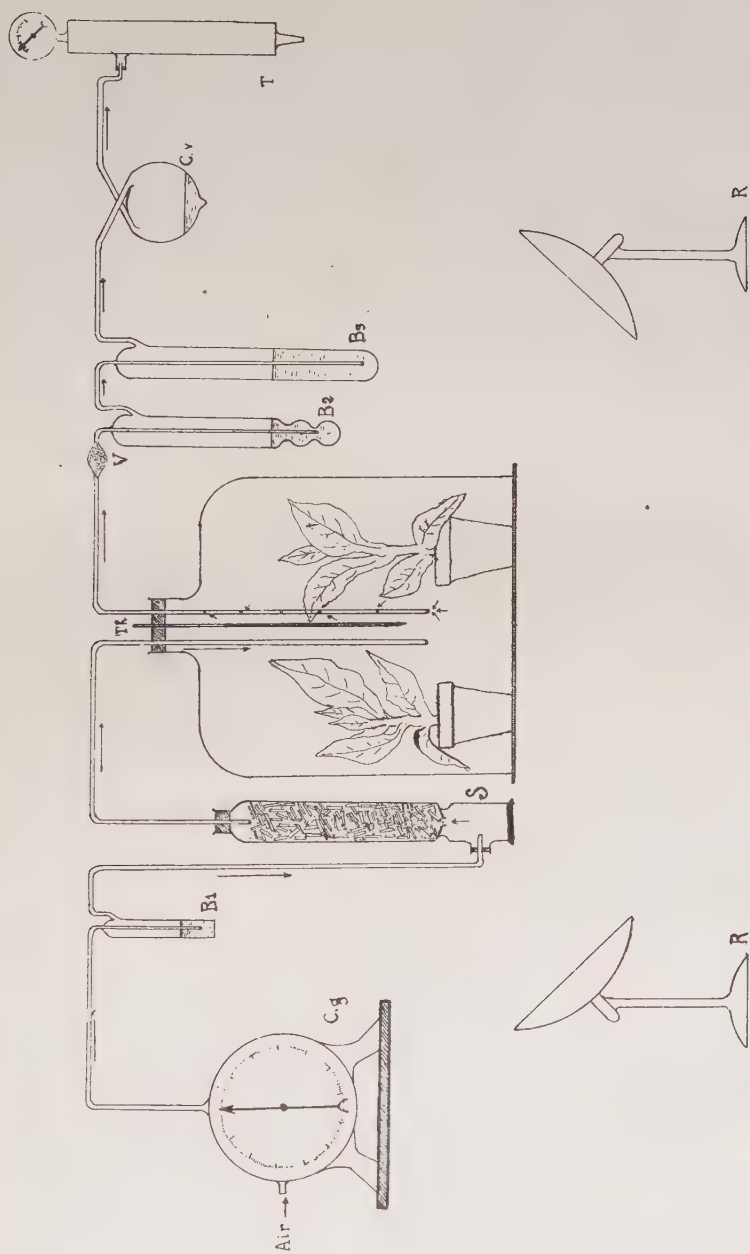


Fig. 24.

3° Une colonne (S) contenant de la soude caustique sèche l'air et le débarrasse de l'acide entraîné.

4° Une cloche à tubulures, où sont disposées les plantes dans lesquelles on veut mettre en évidence l'excrétion et l'évaporation, ou bien les solutions alcaloïdales qui serviront de témoins. Le tube d'arrivée pénètre jusqu'au bas de la cloche. Le tube de sortie est percé de nombreux petits trous à différents intervalles, à seule fin de pouvoir recueillir l'air à plusieurs niveaux de la cloche et d'en assurer la bonne circulation.

Un thermomètre (Th) est destiné à mesurer la température à l'intérieur de la cloche.

Le chauffage est réalisé par deux radiateurs électriques paraboliques (R), maintenant à l'intérieur une température de 30° environ ; les radiateurs sont changés fréquemment de place, pour faire disparaître sur tout le pourtour des parois l'eau de condensation.

5° Une série de barboteurs précédés d'une boule (V) contenant du coton de verre (destiné à arrêter les poussières provenant de la cloche); chacun de ces barboteurs B² et B³ contient 10 centimètres cubes d'une solution d'acide silico-tungstique à 5 p. 100 légèrement acidulée avec quelques gouttes de HCl, N/10 (formule préconisée par G. BERTRAND ; cf., p. 10). Ces barboteurs doivent être assez longs pour éviter la sortie du liquide par suite du bouillonnement.

6° Un condensateur de vapeurs (Cv).

7° La trompe à eau.

Première expérience.

On met sous la cloche une solution très diluée de nicotine pure ; au bout de vingt-quatre heures, on obtient un trouble très visible à l'intérieur de la solution d'acide silico-tungstique (si la solution de nicotine est plus concentrée, il se forme sur les parois et au fond des barboteurs un dépôt blanchâtre insoluble), le liquide est opalescent et présente, si on l'agite, un « chatoiement » dû à la présence de cristaux insolubles.

Au microscope, on aperçoit des cristaux de différentes grandeurs, groupés ou non, de forme généralement rectan-

gulaire et dont certains, plus allongés, se terminent à leurs deux extrémités par un angle rentrant de forme différente; ils présentent au microscope polarisant une très faible réfringence et s'éteignent dans le sens de l'allongement (Cf. à la moitié gauche de la microphotographie 4 de la planche II).

Si l'on fait évaporer l'eau de la solution d'acide silico-tungstique, les cristaux que l'on obtient sont totalement différents. Les cristaux obtenus après passage de l'air de la cloche sont donc bien dus à l'action des vapeurs de nicotine.

Si l'on met dans les barboteurs une solution d'acide silico-tungstique à 10 p. 100, on obtient une opalescence, mais sans formation de cristaux.

Deuxième expérience.

Sous la cloche est disposé un semis de Tabac dans un pot vernissé; un arrosage avec du liquide de KNOR a lieu les jours précédant l'expérience, pour permettre autant que possible une croissance active des plantes.

Au bout de vingt-quatre heures environ, la solution à 5 p. 100 d'acide silico-tungstique des barboteurs de sortie présente un léger louche; l'expérience est poursuivie encore pendant deux jours; arrêtée au bout de soixante-douze heures, le liquide a une opalescence très nette, identique à celle de la première expérience et présentant le même aspect chatoyant. L'examen microscopique montre des cristaux absolument identiques à ceux de l'expérience précédente; les cristaux allongés et terminés par des angles rentrants sont nettement visibles; au Microscope polarisant, la réfringence est la même (Cf. à la moitié droite de la microphotographie 4 de la planche II).

Cette identité a été affirmée par M. MAUGUIN, professeur de minéralogie à la Sorbonne, à qui nous avons soumis les cristaux des expériences 1 et 2.

Troisième expérience.

Elle est effectuée sur une plante de Tabac ayant huit feuilles assez bien développées et mesurant 30 centimètres

de hauteur; la solution employée (10 p. 100) est plus concentrée que dans l'expérience précédente. Au bout de soixante-douze heures, un louche très net s'est produit dans les laveurs de sortie, mais l'examen microscopique de la solution ne montre aucun cristal; les vapeurs de nicotine recueillies dans la solution d'acide silico-tungstique de même concentration présentaient le même trouble et le même aspect sous le microscope. On sait en effet que la formation des cristaux bien constitués exige en général des réactions lentes, s'effectuant notamment dans un milieu très dilué.

Il y a aussi lieu de noter que, vers la fin de cette troisième expérience, les plus grandes feuilles de la plante étaient étiolées.

Quatrième expérience.

Afin de démontrer que la formation du trouble est bien due à une plante alcaloïgène, nous substituons au Tabac, sous la cloche, un semis de Blé (plante dépourvue d'alcaloïdes); au bout de soixante-douze heures, les conditions de chauffage et de circulation d'air étant les mêmes que dans les expériences précédentes, le liquide contenu dans les laveurs est demeuré absolument transparent.

De cette série d'expériences, on peut conclure que les gouttelettes d'exsudation que nous avons mises en évidence, au point de vue microscopique, et dont nous avons indiqué le processus de formation, sont bien réellement constituées par l'alcaloïde produit par la plante, et que cet alcaloïde s'évapore dans l'air ambiant comme le font les essences dans certaines plantes, ou l'iode dans certaines Algues.

Nous verrons plus loin l'importance d'une telle conclusion, et les enseignements que l'on peut en tirer au point de vue de la signification biologique des alcaloïdes dans les plantes.

CHAPITRE V

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES SUR LA SIGNIFICATION BIOLOGIQUE DES ALCALOÏDES

Dans les précédents chapitres, nous avons surtout fait connaître le résultat de nos recherches personnelles sur l'origine et le devenir des alcaloïdes de la plante de Tabac, sans toutefois tirer des conclusions.

Notre travail n'a pas eu pour but, *a priori*, d'infirmier ou de confirmer telle ou telle autre des conceptions ou des théories émises sur la signification biologique des alcaloïdes végétaux. Nous nous sommes toujours efforcé d'exposer aussi objectivement que possible les faits résultant de nos recherches personnelles ; mais le moment est venu de les comparer et de les discuter avec celles des autres chercheurs, de déterminer quels en sont les points communs et ceux qui en sont dissemblables, d'établir la part contributive que nos recherches apportent aux données actuelles de la science, de voir ensuite de quelles conceptions théoriques elles se rapprochent le plus, et enfin de conclure.

On sait combien la signification biologique des alcaloïdes dans les plantes a été débattue, et, très souvent, les solutions proposées pour résoudre le problème ont été d'ordre plus spéculatif qu'expérimental ; la littérature ayant trait aux alcaloïdes est donc extrêmement importante. Aussi, délaissant les théories à tendance plus ou moins finaliste, nous ne citerons que les travaux les plus marquants établis sur des données purement scientifiques. Pour les compléments et le détail des expériences, on trouvera dans l'excellent ouvrage de GORIS et dans la lecture du mémoire plus récent et si documenté d'A. GUILLAUME de nombreuses considérations d'ordre chimique de la plus haute importance.

On a voulu trop souvent, à tort, lier les hypothèses de la

formation des alcaloïdes à celui de leur rôle; aussi, comme nous l'avons fait pour l'exposé de nos recherches, nous traiterons l'histoire biologique des alcaloïdes suivant deux idées directrices principales : 1^o celle de leur origine; 2^o celle de leur devenir. Nous verrons ensuite quels sont les points communs de ces deux aspects du problème.

I. — CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES SUR L'ORIGINE DES ALCALOÏDES

Les théories qui ont été émises antérieurement à nos recherches au sujet de l'origine des alcaloïdes peuvent se ranger en deux groupes :

- 1^o Théories basées sur des considérations d'ordre chimique ;
- 2^o Théories basées sur des considérations d'ordre physiologique et expérimental.

Nos recherches tendent à établir un troisième groupe comprenant les théories basées sur des considérations d'ordre histologique, et qui servirait d'appoint aux conclusions que l'on a pu tirer des essais de localisation microchimique.

A. — THÉORIES BASÉES SUR DES CONSIDÉRATIONS D'ORDRE CHIMIQUE

On peut diviser ces théories en deux classes :

- a.* Théories de PICTET, WINTERSTEIN et TRIER, faisant dériver les alcaloïdes des protéines ;
- b.* Théorie de DUNSTAN, établissant que les alcaloïdes seraient en relation avec le métabolisme des glucides.

a. — THÉORIES DE PICTET.

L'on sait que la plupart des alcaloïdes sont constitués par un noyau pyrolique, puridique, bétaique, etc., ce qui a permis de les classer en familles chimiques. Les matières albuminoïdes présentant des noyaux identiques, il existerait des rapports étroits entre ces deux groupes de corps.

Pour PICTET, la matière albuminoïde serait toujours la

substance génératrice des alcaloïdes; leur décomposition donnerait naissance, dans le Tabac en particulier, à un noyau pyrolique et, par suite d'une méthylation par l'adhyde formique, conduirait aux alcaloïdes. Pour cet auteur, les alcaloïdes proviendraient de la désagrégation de matériaux plus complexes qui se condenseraient avec d'autres composés coexistant dans le végétal.

WINTERSTEIN et TRIER se rangent au même avis, mais, pour ces auteurs, la méthylation serait le fait de l'alcool méthylique, et ils définissent les alcaloïdes « comme des composés azotés qui apparaissent pendant la formation ou la dégradation des matières albuminoïdes ».

b. — THÉORIE DE DUNSTAN.

Pour cet auteur, l'amidon et les sucres donneraient naissance par oxydation à des acides organiques qui, se combinant avec l'ammoniaque, conduiraient aux dérivés pyridiques et, par suite, aux alcaloïdes.

Mais l'une ou l'autre de ces théories sont entièrement hypothétiques; la réalisation des réactions signalées est possible sans doute *in vitro*, et à l'aide de la chaleur ou de réactifs violents, mais rien ne prouve que la plante, dans son chimisme cellulaire, agisse de même.

B. — THÉORIES BASÉES SUR DES CONSIDÉRATIONS D'ORDRE PHYSIOLOGIQUE ET EXPÉRIMENTAL

Ces théories se divisent en deux groupes (1) :

(1) Les essais de dosage du principe actif dans les plantes alcaloïfères, en tenant compte des variations du milieu de culture ou des divers engrais, ne peuvent pas nous renseigner sur l'origine des alcaloïdes; ils ont simplement permis d'établir, d'une façon générale, que tout engrais qui active la croissance augmente la teneur alcaloïdale. [L'influence sur le taux alcaloïdal de certains engrais (nitrates) a été étudiée par CHUARD et MELLET dans le Tabac]. Cette corrélation ne semble pas être absolument sûre pour certaines plantes alcaloïfères; c'est ainsi que A. MAURIN établit par des dosages que les cultures de *Datura Stramonium*, faites en milieu riche en sulfate de potasse, avaient leur croissance nettement accentuée, alors que la production d'alcaloïdes était en régression par rapport aux plantes témoins, dont la croissance était moins marquée. A. GUILLAUME fait des observations analogues avec les cultures de *Lupinus variabilis* réalisées dans des milieux riches en sulfate de potassium.

a. Les alcaloïdes proviendraient directement des matières protéiques ;

b. Les alcaloïdes ne seraient qu'un produit secondaire du dédoublement des protéïdes (1).

Dans le premier groupe, nous devons d'abord citer les expériences de CIAMICIAN et RAVENNA, tendant à transformer les théories chimiques de PICTET en une théorie semblable d'ordre expérimental; ces auteurs cherchent à démontrer que les alcaloïdes dérivent des bases puridiques et pyroliques. Leurs expériences sont basées sur l'inoculation de certains corps chimiques à l'intérieur des plantes ; si les produits injectés disparaissent en augmentant la teneur en alcaloïdes, on peut en déduire qu'ils sont spécifiques dans la synthèse de l'alcaloïde considéré (les essais ont été faits sur la plante de Tabac).

Dans une première série d'expériences, 12 grammes de pyridine, inoculés à trois plants, disparaissent complètement, et 18 grammes de pipéridine ne sont pas entièrement détruits.

Dans la deuxième série d'expériences, les essais d'inoculation vont être suivis des dosages de nicotine comparative-ment à des plantes témoins. Elle est ainsi conçue : on inocule 1 100 grammes de tartrate de pyridine à 90 pieds de Tabac; les plantes sont recueillies et analysées dix jours après la dernière inoculation ; le résultat des examens chimiques montre la disparition du tartrate de pyridine injecté et une augmentation concomitante de la base végétale. Il semble donc bien que la pyridine a une action spécifique sur la formation des alcaloïdes du Tabac et que la théorie de PICTET est confirmée.

La troisième série d'expériences ne permet pas d'être aussi affirmatif; elle consiste à injecter à plusieurs séries de plantes de Tabac non seulement du tartrate de pyridine, mais du tartrate d'ammonium et de l'asparagine, et aussi des corps dépourvus d'azote, d'une part du glucose, et d'autre

(1) Il y a dans ces deux cas une exception curieuse aux conceptions de tous les microchimistes qui considèrent la production des alcaloïdes comme intimement liée à l'activité cellulaire.

part, de l'acide phtalique, qui est une substance aromatique très oxygénée.

Les résultats sont alors les suivants : dans les plantes témoins, la teneur alcaloïdale étant de 1,49, elle passe à 2,50 dans les plantes inoculées avec de l'asparagine, à 1,81 avec la pyridine, 2,15 avec le glucose, 1,93 avec le tartrate d'ammonium et 1,51 avec l'acide phtalique.

Les auteurs sont donc obligés de conclure que leurs expériences ne sont pas suffisamment sûres pour qu'on puisse en tirer des conclusions sur l'origine des alcaloïdes. Il leur semblerait toutefois que les alcaloïdes dériveraient des acides aminés, puisque l'asparagine conduit à une augmentation maximum des alcaloïdes par rapport aux autres corps injectés.

D'ailleurs, le seul fait de traumatiser la plante par des inoculations serait suffisant pour expliquer l'augmentation de nicotine; les savants italiens constatent que, dans les plantes blessées, le taux d'alcaloïdes était de 1,90 (témoins = 1,49).

Des observations analogues ont été faites au point de vue microchimique par RIPPERT sur la Belladone, par MOLLE sur *Clivia miniata*, et par nous-même sur la plante de Tabac. Comme ces divers auteurs, nous avons constaté que les traumatismes les plus divers, tels qu'entailles, grattements, piqûres, etc., amenaient une augmentation notable de la teneur alcaloïdale, non seulement par la création de tissus cicatriciels riches en principe actif, mais aussi par une augmentation très sensible de la richesse alcaloïdale dans toutes les cellules voisines de la région lésée.

Les conclusions de CIAMICIAN et RAVENNA faisant dériver les alcaloïdes des amides paraissent être reprises par G. PARIS, pour lequel la nicotine de la plante de Tabac se formerait aux dépens de l'azote soluble (amidé). A cet effet, il établit la série d'expériences suivantes : des feuilles de Tabac sont coupées longitudinalement et séparées en deux lots : l'un est mis à flotter sur de l'eau distillée, l'autre est disposé à la lumière diffuse sur une solution de chlorure d'ammonium à 0gr,25 p. 100; dans ce deuxième lot, la teneur alcaloïdale augmente par rapport au témoin, en même temps qu'à lieu

une diminution de chlorure d'ammonium qui a été absorbé par les feuilles.

Quel que soit l'intérêt de cette expérience, remarquons que le fait de séparer les feuilles en deux parties peut conduire à des perturbations dans la vie des cellules, dont le chimisme normal doit être alors arrêté assez rapidement.

Les autres auteurs se bornent à doser comparativement l'alcaloïde et les protéines; c'est ainsi que CLAUTRIAU, dans les diverses recherches sur l'annélation du Caféier, sur la capsule de Pavot, ou sur la germination des graines dépourvues d'alcaloïdes (Tabac, Thé, etc.), prouve que, dans tous ces divers cas, à une augmentation d'alcaloïde correspond une diminution de matières protéiques, et il en déduit que les alcaloïdes proviennent de la destruction de matériaux azotés plus complexes.

Les recherches de RIPPERT sur la Belladone tendent à établir que la teneur en alcaloïdes croît parallèlement à la teneur en albuminoïdes, et ceci tout aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité, ou dans des cultures sur eau distillée (toute nutrition minérale étant alors supprimée). L'auteur conclut de ses expériences que « les alcaloïdes proviennent de la molécule d'albumine lors de sa désassimilation ».

Plus récemment, A. GUILLAUME établit que, dans *Lupinus variabilis*, il y a augmentation d'alcaloïde jusqu'au moment de la floraison de la plante et, d'une façon concomitante, diminution de l'azote protéique, aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité. Pour ce savant, l'alcaloïde se formerait au moment de la protéolyse, puisqu'il y a diminution de protéines.

Dans le deuxième groupe figurent des recherches en général plus récentes; ce sont d'abord celles de WEEVERS, pour lequel l'alcaloïde se formerait au moment de la protéolyse et ne serait pas le résultat direct du dédoublement des matières protéiques, mais seulement un produit secondaire de ce dédoublement. Il s'appuie sur ce fait que l'hydrolyse artificielle de l'albumine du Caféier ne donne pas d'alcaloïdes. Dans ses différentes recherches sur les feuilles de plantes alcaloïfères telles que *Thea assanica*, *Cinchona succirubra*, ou sur la

germination de *Coffea arabica*, faites à l'obscurité, l'auteur démontre que les alcaloïdes augmentent toujours en même temps qu'a lieu une diminution concomitante des protéines.

Pour K. MOTHEs, le métabolisme de la nicotine possède une extrême stabilité, les facteurs externes de nutrition et d'éclairage étant sans grande action. Même avec une grande activation du processus de désassimilation, la décomposition des protéines ne conduit pas à une formation d'alcaloïdes; il existerait seulement des relations entre le métabolisme nicotinique et une protéine déterminée que nous ne savons pas isoler.

Enfin ILIYN, étudiant la formation de la nicotine pendant la germination de la graine de Tabac, constate que l'alcaloïde se forme aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité, sans qu'il existe un parallélisme étroit avec la dégradation des protéines.

Lorsqu'on soumet les plantules de Tabac à l'action du toluol, en présence d'oxygène, on observe une décroissance rapide de la teneur en amino-acides, en amides et en nicotine.

ILIYN interprète ainsi cette expérience : la nicotine ne provient pas directement de l'hydrolyse des protéines, mais elle naît secondairement par un processus de synthèse unissant des produits azotés simples, dérivant de la décomposition des protéines, à des substances organiques sans azote.

En résumé, toutes ces opinions, basées sur des expériences soit chimiques, soit physiologiques, tendent, sauf la théorie de DUNSTAN, à faire dériver les alcaloïdes des protéines d'une façon plus ou moins directe; mais, comme l'écrit GUILLAUME à la fin de son intéressant mémoire : « Ce n'est là qu'une simple constatation; nous n'avons pas pu établir d'expérience directe pour prouver que le dédoublement des matières protéiques se transformerait en alcaloïdes. »

Nos observations tendent à confirmer la réalité d'une relation entre le métabolisme des protéines et la production des alcaloïdes; nous apportons à cet effet des arguments cytologiques, les *premiers* qui aient été produits dans ce domaine.

De nos recherches sur la localisation de la nicotine dans l'élément cellulaire il résulte que l'alcaloïde se forme tou-

jours à l'intérieur des vacuoles. Ce fait, en lui-même, n'apporte aucune précision sur l'origine des alcaloïdes, car l'on sait que les vacuoles contiennent des produits les plus divers (protéines, sucres, diastases, tanins, etc.) ; mais les localisations que nous avons faites dans la graine en voie de germination sont du plus grand intérêt au point de vue de l'origine des alcaloïdes.

Nous avons, en effet, prouvé que la nicotine apparaissait au moment de la germination à l'intérieur des grains d'aleurone, alors même que ceux-ci contenaient encore leur cristalloïde de protéine; d'autre part, la nature chimique de ces corpuscules est nettement connue comme étant constituée par des matières protéiques.

Nous croyons donc qu'il est intéressant de souligner ce fait de l'apparition de la nicotine au moment de la fonte des grains d'aleurone et au sein même des matières protéiques constituant ceux-ci, et d'en déduire que cette constatation est évidemment très favorable à l'hypothèse d'une origine protéique de la nicotine; les matières protéiques hydratées se transformeraient alors en alcaloïde et à l'aide de phénomènes diastasiques qui nous sont inconnus.

Dans l'état actuel de nos connaissances, nos recherches nous paraissent être les plus précises qui aient été faites au sujet de l'origine des alcaloïdes par un examen direct des éléments alcaloïgènes.

Il est aussi possible, mais non certain, que la formation des alcaloïdes aux dépens des matières protéiques du grain d'aleurone ne constituerait qu'un cas particulier d'un phénomène général, se produisant dans toutes les cellules alcaloïgènes de la plante.

Nous avons vu, en effet, que partout où se produisaient des phénomènes de croissance, ou encore dans tous les éléments où l'activité cytoplasmique était intense, la teneur en alcaloïdes était très grande. Nous pensons donc qu'une partie des protéines constituant le cytoplasme serait alors dégradée, passerait dans les vacuoles et se transformerait alors en alcaloïdes suivant des procédés inconnus analogues à ceux qui se produisent à l'intérieur des vacuoles issues de

l'hydratation des grains d'aleurone ; ces substances albuminoïdes dégradées seraient sans doute assez différentes de celles qui forment le cytoplasme et ne seraient autre chose que la protéine inconnue, signalée par MOTHES, et que nous avons recherchée au sein des mitochondries.

D'ailleurs, il est difficile de concevoir pourquoi la nicotine, apparaissant au sein des matières protéiques vacuolaires, dans les tissus de la plantule en voie de germination, se formerait par un mécanisme différent dans les vacuoles de la plante adulte.

Cette deuxième partie de nos conclusions, que nous considérons malgré tout comme hypothétiques, nous rapprocherait donc des conceptions de WEEWERS, de MOTHES et de ILIYN.

II. — CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES SUR LE DEVENIR DES ALCALOÏDES

Cette deuxième partie du cycle de l'alcaloïde dans la plante est celle qui a été l'objet des recherches les plus nombreuses.

Une première constatation s'impose : c'est que, d'une manière générale, les alcaloïdes augmentent depuis la germination jusqu'à la floraison, diminuent ensuite jusqu'à la maturation du fruit et de la graine, ou en d'autres termes ; dans un organe déterminé, la courbe d'augmentation de la teneur alcaloïdale est ascendante jusqu'à la pleine croissance et descendante ensuite à partir de la floraison.

Cette diminution des alcaloïdes est démontrée soit au point de vue microchimique, soit par des dosages de très nombreux auteurs, en particulier par J. CHEVALIER pour la spartéine, TUNMANN et JENZER dans les feuilles de *Coca*, FELDHAUS pour les alcaloïdes de *Datura Stramonium*, RIPPERT et BEAUSITE pour ceux de la Belladone, KELLNER, K. MAKINO et K. OGASAWARA pour la caféine des feuilles de Thé, WEEWERS pour les bases végétales contenues dans *Paullinia cupana*, et GUILLAUME pour les alcaloïdes de *Lupinus variabilis*.

La constatation de la diminution de la nicotine dans la plante de Tabac devra retenir plus longuement notre attention, certains des résultats obtenus étant moins connus.

L'étude de la teneur en nicotine du Tabac aux différents stades de son développement a été faite surtout dans un but pratique : celui de connaître à quel moment de la vie de la plante cette teneur est la plus grande et de savoir quelle est l'influence des pratiques culturales d'écimage et d'ébourgeonnement sur ce taux (les écimages et les ébourgeonnements se traduisant par une augmentation dans la grandeur des feuilles laissées sur la plante).

Dès 1883, SCHLÆSING père, dans ses *Leçons de Chimie agricole*, professées à l'école d'application des Manufactures de l'État, montre que le taux de nicotine croît graduellement pendant la végétation en même temps que le poids de la plante ; mais celui-ci augmente plus rapidement que le taux de nicotine ; c'est ainsi que le taux p. 100 de nicotine et le poids étant exprimés par 1 le 18 juillet, ils passent à 2,29 (poids de la plante) et 1,53 (taux de nicotine) le 6 août ; 4,38 et 2,44 le 27 août ; 5,13 et 2,92 le 8 septembre ; 6,17 et 4,25 le 25 septembre ; 6,15 et 5,36 le 24 octobre.

Le dosage des alcaloïdes des plantes écimées par rapport aux plantes porte-graines donne les résultats suivants (taux p. 100 de nicotine).

	Alsace 1861.	Havane 1861.	Havane 1863.
Porte-graines	1,29	2,40	2,00
Plantes écimées	3,73	6,60	5,08

Le nombre des feuilles laissées sur la plante a aussi une influence sur la teneur en nicotine et sur le poids de la plante ; les plantes de 14 feuilles étant prises comme unité, on obtient les résultats suivants :

	14 feuilles.	10 feuilles.	6 feuilles.
Alsace. { Poids.....	1	1,25	1,82
{ Nicotine	1	1,27	1,72
Pas-de-Calais. { Poids.....	1	1,14	1,56
{ Nicotine	1	1,16	1,37

SCHLÆSING montre aussi qu'il existe des variations dans le taux alcaloïdal suivant la position des feuilles, c'est-à-dire suivant leur développement et leur âge (les feuilles du bas étant prises comme unité) ; les résultats sont les suivants :

	Bas.	Milieu.	Haut.
Alsace	1	1,04	1,06
Pas-de-Calais	1	1,07	1,39

En 1910, SCHLÆSING fils, ayant réalisé de grandes cultures de Tabac, dans l'Ille-et-Vilaine et dans le Lot, est conduit, par des dosages, à faire des constatations analogues : c'est-à-dire que le taux de nicotine élaborée a baissé considérablement lorsqu'on a laissé pousser sur la plante toutes les feuilles, sans écimage ni ébourgeonnement.

En 1912, CHUARD et MELLET présentent à l'Académie des Sciences des résultats identiques, prouvant qu'il y a nettement diminution de la teneur en alcaloïdes lorsque la plante vieillit.

Nous pouvons encore citer, dans ce sens, les travaux des collaborateurs de SCHLÆSING : PERREAU et FOUQUET d'une part, BLOR d'autre part, dont les résultats sont concordants avec ceux que nous venons de mentionner.

En 1923, OOSTHUIZEN démontre que le taux de nicotine diminue si on laisse trop mûrir les plantes, ou si on les laisse sécher, la diminution étant plus accentuée si elle est opérée au soleil. En 1924, le même auteur, avec la collaboration de CUTLER et THERON, signale à nouveau que la teneur en nicotine augmente, en même temps que la maturation de la plante passe par un maximum lorsque la feuille est mûre, après quoi la nicotine baisse très rapidement.

De nombreux auteurs, en particulier FILIP, ont prouvé que la perte de nicotine se poursuit pendant la période de séchage et de fermentation.

Pour MOTHES, il existerait une décomposition très faible de nicotine dans les vieilles feuilles seulement ; mais les différences que l'on peut constater avec l'âge dans les feuilles ne seraient conditionnées que faiblement par cette décomposition

de nicotine, mais surtout par l'arrêt de la synthèse de la base végétale.

Nos recherches faites au point de vue microchimique complètent ces diverses données ; elles ont montré que, dans un organe déterminé, la teneur alcaloïdale baissait considérablement à la fin de la végétation, les racines des plantes adultes étant en particulier presque dépourvues d'alcaloïdes ; elles ont aussi mis en évidence que, dans les plantules étiolées par privation d'aliments, ou par de mauvaises conditions culturales, la teneur alcaloïdale décroissait rapidement ; la perte de nicotine peut être telle, dans certains cas, qu'avant le flétrissement complet l'alcaloïde a presque entièrement disparu.

Cette dernière étude ne paraît pas avoir été antérieurement l'objet de nombreuses recherches : à notre connaissance, nos résultats confirment seulement ceux de SAVAX, qui prouve que, dans *Strychnos Nux-vomica* étioilé, les alcaloïdes disparaissent peu à peu, la disparition étant plus rapide dans la racine ou dans la tige que dans les feuilles, cette disparition étant accélérée sous l'effet d'une température plus élevée et d'une humidité croissante de l'atmosphère.

Que devient donc l'alcaloïde qui disparaît de la plante ?

Répondre à cette question nous conduit à exposer les diverses conceptions qui se sont affrontées pour résoudre le problème du rôle biologique des alcaloïdes. Nous ne ferons que citer ou résumer ces diverses théories ; le lecteur trouvera dans l'ouvrage de GORIS tous renseignements complémentaires ; mais nous nous étendrons plus longuement sur la possibilité de perte d'alcaloïdes par la voie gazeuse, qui a été supposée par divers auteurs sans qu'ils aient pu en apporter la preuve, que nos recherches semblent avoir établie.

La plus ancienne de ces théories est aujourd'hui complètement abandonnée : c'est celle d'ERRERA et de ses élèves, de CLAUTRIAU en particulier, qui considèrent les alcaloïdes comme des moyens de défense naturelle des plantes contre les agents extérieurs ; la critique très simple et très juste qu'en a faite le livre de TARGIONI TOZZETTI est toujours valable.

La plus récente des théories, celle de CIAMICIAN et RA-

VENNA, tendant à donner aux alcaloïdes le rôle d'hormones végétales, ne paraît pas avoir été bien solidement étayée par des preuves certaines. Le travail considérable des deux auteurs italiens n'en demeure pas moins du plus grand intérêt ; il a en effet permis, par exemple, de démontrer que les alcaloïdes du Tabac inoculés à des plantes non alcaloïgènes (Maïs) pouvaient être rejetés par l'eau de transpiration, alors que les mêmes bases inoculées à la plante qui les produit (Tabac) ne se retrouvent pas dans l'eau de transpiration.

Restent donc en présence les deux théories principales de l'alcaloïde « substance de réserve » et de l'alcaloïde « substance de déchet ».

A. — L'ALCALOÏDE « SUBSTANCE DE RÉSERVE »

La première de ces conceptions, considérant les alcaloïdes comme des substances de réserve pouvant être éventuellement utilisées par la plante, a eu comme premier défenseur HECKEL (1890). Ce savant se base sur ce fait : dans les graines de Kola (*Sterculia acuminata*), la caféine disparaît peu à peu au moment de la germination, et en même temps, dit-il, il se forme des produits nouveaux ; il en conclut que les alcaloïdes sont, dans les semences, de véritables réserves alimentaires qui, pour être assimilées, ont besoin d'être transformées dans leur constitution chimique (1).

GAUCHER arrive aux mêmes conclusions avec les graines de *Coffea arabica*.

ALBO se prononce nettement en faveur de l'alcaloïde « substance de réserve » ; les arguments qu'émet l'auteur italien peuvent servir de « type » pour toutes les recherches qui ont été faites dans le même sens.

Pour cet auteur, la présence d'alcaloïde dans les méristèmes et, en général, dans tous les tissus de néo-formation, prouve que de tels matériaux doivent servir à la nutrition

(1) Les recherches faites en 1902 par CLAUTRIAU infirment entièrement les résultats d'HECKEL.

et à la production de nouveaux éléments anatomiques. Comme on l'a fait remarquer maintes fois, cet argument ne peut rien démontrer, car, si les alcaloïdes se trouvent dans les tissus de grande activité cellulaire, rien ne prouve qu'ils soient utiles à la construction de nouveaux éléments ; on peut, en effet, tout aussi bien les considérer comme des déchets de cette activité.

ALBO affirme ensuite que, lorsqu'on procède à l'écimage des plantes de Tabac (ou de toute autre plante alcaloïfère), la quantité de nicotine est presque triple de celle que l'on trouve dans les plantes qui peuvent porter leurs graines à maturité. Dans ce deuxième cas, la nicotine émigrerait donc dans les cotylédons, où elle se transformerait en matière de réserve utilisée au moment de la germination. Au premier abord, il semblerait bien que la diminution d'alcaloïdes dans la plante porte-graine par rapport à la plante écimée fût un argument sérieux en faveur de la migration de la nicotine vers les pièces florales et ensuite vers la graine, mais, quand bien même cette migration existerait (1), rien ne prouve que les alcaloïdes se seraient transformés en protéines, car ils pourraient avoir disparu de toute autre façon. L'argument d'ALBO est d'ailleurs insuffisant, car cet auteur n'a pas dosé les protéines soi-disant formées à partir des alcaloïdes.

Le dosage des matières albuminoïdes avait été fait par BLot en 1886 ; cet auteur démontre que le taux des substances azotées s'est élevé de 12 à 16 p. 100 dans les plantes écimées ; dans les porte-graines, ce taux a diminué de 12 à 9 p. 100 ; d'autre part, du 10 août au 20 octobre, le poids des feuilles de Tabac a augmenté de 3 p. 100 dans les porte-graines et de 46 p. 100 dans les plantes écimées. Mais la critique que l'on pourrait faire des observations d'ALBO, en prenant connaissance de celles de BLot, ne pourrait donner aucun résultat. En effet, BLot n'a pas détaillé, comme le font d'ailleurs trop de chimistes, les organes étudiés par lui ; c'est là une erreur au point de vue physiologique : il aurait fallu préciser si les

(1) Signalons que, pour Mothes, il n'existe pas de migration notable d'alcaloïde d'organe à organe.

analyses concernaient la plante entière, y compris les graines, ou seulement les parties végétatives.

Il est donc impossible de rien tirer de net des travaux d'ALBO, ni des analyses de BLOT.

Enfin on a tenté d'appuyer la théorie de la valeur alimentaire des alcaloïdes, théorie que l'on peut confondre avec celle de l'alcaloïde « matière de réserve » par des expériences tendant à démontrer la valeur alimentaire (sous forme d'engrais) de ces bases végétales sur certaines plantes.

Les essais ont été nombreux (MARCET, MACAIRE PRINCEPS, BOUCHARDAT, RÉVEIL, MARÇACCI, CORNEVIN, J.-B. DE TONI et MACH, MOSSO, MIRANDE) et les résultats des plus contradictoires, donc des plus confus. Les recherches principales faites dans ce sens sont celles de DE VARIGNY, qui infirme les recherches de RÉVEIL et prouve que l'atropine ne joue pas le rôle d'un engrais, et que, au contraire, les plantes poussées dans des milieux riches en atropine diminuent de poids.

LUTZ reprend l'étude du problème par des expériences mieux conduites et fait germer soit des graines de Phanérogames, soit développer des Champignons ou des Algues, dans des milieux synthétiques rigoureusement aseptisés, milieux additionnés soit de sels d'alcaloïdes, soit de sels organiques ; ces expériences l'amènent à conclure que les alcaloïdes ne sont pas des réserves au sens propre du mot, mais plutôt des formes intermédiaires entre la matière minérale et la matière albuminoïde, dont l'utilisation serait subordonnée à un afflux d'azote minéral.

Les travaux les plus importants et les plus intéressants pour prouver que l'alcaloïde se forme dans la protéolyse et joue un rôle dans la protéogenèse sont ceux de WEEWERS, qui se sont poursuivis depuis 1903 jusqu'à nos jours. Les expériences de ce savant se rapportent surtout à des plantes à caféine (*Paullinia Cupana*, *Thea assanica*, *Ilex paraguayensis*, etc.), dans lesquelles à une perte d'alcaloïde correspond une augmentation de matières albuminoïdes ; l'expérience la plus probante nous paraît être la suivante : des feuilles de Thé bien développées sont détachées de la plante, divisées

en deux moitiés suivant la nervure médiane et placées dans l'eau distillée, les unes à l'obscurité, les autres à la lumière, en présence ou en l'absence de CO_2 ; chez les premières, comme nous l'avons déjà indiqué, la teneur en alcaloïde augmente de 27 p. 100 par rapport au témoin, et on assiste à une diminution concomitante des matières protéiques. A la lumière, avec assimilation intense, on observe une perte de 20 p. 100 d'alcaloïdes; mais, alors que cent moitiés de feuilles ont ainsi perdu 11 milligrammes de caféine, elles se sont enrichies de 12 milligrammes de matières protéiques; il semble donc que l'azote de ces matières protéiques ne puisse provenir que de celui qui a été perdu par la caféine (les feuilles étant disposées dans l'eau). Des expériences donnant des résultats comparables sont réalisés sur la cinchonine de *Cinchona succirubra* (résultats obtenus dans des plantes de serre, forcées au Jardin des Plantes d'Amsterdam, c'est-à-dire dans des conditions de vie anormales).

Pour comparer ces résultats avec les nôtres, il y a lieu de bien mettre en évidence les différences de nature physique et chimique de la caféine et de la nicotine: la caféine dérive de la purine, qui provient très vraisemblablement de la destruction des nucléo-protéines, la nicotine dérive d'un noyau pyrrolique; la caféine se présente sous forme de fines aiguilles cristallines, la nicotine est liquide; la caféine ne s'évapore qu'à 177° , la nicotine est volatile à la température du laboratoire (15° - 20°). Il est donc naturel que ces deux alcaloïdes se comportent différemment dans les plantes qui les produisent.

B. — L'ALCALOÏDE « SUBSTANCE DE DÉCHET »

Les arguments en faveur de cette théorie sont bien connus; ils sont basés, d'une part, sur la répartition des alcaloïdes dans les régions périphériques des organes, ou encore dans certaines plantes, dans les laticifères, régions que l'on ne peut guère considérer comme des tissus de réserve; d'autre part, sur le fait qu'ils ne sont pas utilisés pendant la germination

dans les graines pourvues de principe actif (1); enfin sur leur apparition au moment de la digestion des réserves dans les graines dépourvues d'alcaloïdes (Tabac).

L'argument le plus sérieux en faveur de cette théorie est celui qui résulte des dosages comparatifs des alcaloïdes et des protéines, montrant que lorsque, dans certaines conditions, la plante est placée en dehors de toute alimentation azotée, l'alcaloïde augmente, tandis que l'on assiste à une diminution concomitante de protéines; ces derniers arguments doivent retenir notre attention.

Les principales recherches faites dans ce sens sont celles de CLAUTRIAU (1892). Cet auteur établit que, dans les capsules de Pavot, l'alcaloïde disparaît progressivement et que la graine mûre en est dépourvue.

En prenant ces capsules et en les laissant séjourner et mûrir sur de l'eau distillée (en dehors de toute alimentation azotée), il constate que l'azote alcaloïdal diminue rapidement et que l'azote albuminoïde diminue de même de 21 p. 100; ce premier n'a donc pas été utilisé à la formation de la molécule protéique. Le même auteur, ayant procédé à l'annélation des rameaux de Caféier, constate une diminution de caféine par rapport au témoin (expériences faites à l'air et à la lumière). Dans ces deux cas, il y a diminution de l'azote total; il ne peut donc pas être question de l'utilisation de l'azote alcaloïdal en azote albuminoïde.

Des expériences sont faites avec des rameaux de Thé, plongés dans des solutions nutritives avec ou sans azote; l'auteur en conclut que la quantité de caféine n'est pas directement influencée par l'absence ou la présence d'aliments azotés, et que la caféine ne constitue pas une réserve azotée pour la plante.

Enfin les expériences de CLAUTRIAU sur la germination des grains de Café montrent que, contrairement à l'opinion d'HECKEL, il n'y a pas diminution d'alcaloïdes; on constate, au contraire, une augmentation.

Les expériences et les dosages de RIPPERT portant sur des

(1) Les graines de *Datura Stramonium* privées de leur tégument contenant des alcaloïdes germent comme les graines normales.

pieds de Belladone, en pleine floraison, mais aucun fruit n'y étant formé, et introduits dans des bocaux remplis d'eau distillée et sur lesquels on opère le dosage comparatif des alcaloïdes et de l'azote albuminoïdique, amènent cet auteur à conclure que, « sans alimentation minérale d'aucune sorte, la plante a continué à végéter, n'assimilant pas ses alcaloïdes et détruisant ses albuminoïdes ». Le même auteur renouvelle son expérience sur des plantes dont les tiges trempent dans l'eau distillée et qui sont disposées sous une cloche où se fait un renouvellement d'oxygène. L'activité vitale est ainsi accélérée, et la plante se trouve dans l'obligation d'utiliser les réserves ; il constate alors à nouveau qu'il y a augmentation de 0,231 p. 100 d'alcaloïdes et diminution de 0,83 p. 100 d'albuminoïdes.

Les expériences d'A. GUILLAUME, sur des plantes de *Lupinus variabilis*, faites sur des milieux azotés ou non azotés, conduisent l'auteur à conclure « que les différences constatées dans les teneurs en alcaloïdes par plantules sont trop faibles pour permettre de conclure que la plante « affamée d'azote » a utilisé ses alcaloïdes ».

En résumé, pour tous ces auteurs, et nous pourrions en allonger la liste, l'alcaloïde, en disparaissant, ne se transforme pas en matière protéique ; mais cette affirmation ne nous conduit pas à savoir ce que devient l'alcaloïde perdu.

Plusieurs solutions ont été proposées pour résoudre ce problème ; la plupart ne sont qu'hypothétiques ; d'autres, basées sur des expériences, n'ont donné antérieurement à nos recherches que des résultats très peu probants. Ces solutions peuvent se ramener à quatre types principaux : 1^o l'alcaloïde disparaîtrait par passage dans l'eau de germination ; 2^o l'alcaloïde étant décomposé, la disparition de l'azote se ferait sous forme gazeuse ; 3^o il y aurait décomposition de l'alcaloïde conduisant à NH_3 qui serait évaporé ; 4^o l'alcaloïde serait excrété directement dans les parties aériennes de la plante, comme le sont les essences dans certaines plantes ou l'iode dans certaines Algues.

a. — 1^o L'ALCALOÏDE DISPARAÎT-IL DANS L'EAU
DE GERMINATION?

CLAUTRIAU le premier a constaté que, dans un lot de graines de *Coffea arabica*, mises à germer sur du papier humide, certaines restent stériles et ne germent pas ; elles perdent alors une grande partie de leur caféine ; voici les résultats :

Graines n'ayant pas germé	2,82 p. 100
Graines n'ayant pas germé et laissées trois mois entre du papier humide	1,70 p. 100 (1).

TUNMANN fait des constatations analogues sur les graines de *Strychnox Nux-Vomica* ; alors que dix graines de cette plante contiennent 0,556 d'alcaloïdes, une partie de ceux-ci (0,196) est rejetée avec les téguments et 0,105 sont dissous par l'eau de germination ; enfin, ainsi que nous le verrons plus loin, une dernière partie de l'alcaloïde se retrouverait sur les cotylédons, mêlée à des mucilages. Toutefois, TUNMANN n'a pas pu mettre en évidence l'alcaloïde rejeté dans le sol.

Plus récemment, GUILLAUME obtient des résultats semblables pour les graines de Lupin et constate d'abord que « l'eau dans laquelle les graines avaient été mises à macérer renfermait, après trois jours, des quantités d'alcaloïdes loin d'être négligeables (0^{mg},20 par graine) », et que, d'autre part, « cette quantité était d'autant plus considérable que la macération était plus prolongée et que l'acidité de l'eau était plus forte ».

La deuxième série d'expériences de cet auteur consiste à mettre germer 30 grammes de graines de Lupin sur du coton humide et à côté d'un petit cristalliseur renfermant SO⁴H² à 1/20, le tout étant recouvert d'un entonnoir dont les parois sont humectées du même acide dilué. Après six jours, les plantes ayant germé, l'expérience est arrêtée ; les parois de

(1) Ce résultat ne peut pas intéresser les germinations de Tabac chez lequel la graine ne contient pas de nicotine. Ceci souligne à nouveau les différences notables que l'on peut rencontrer dans les différentes plantes alcaloïfères.

l'entonnoir sont rincées à l'eau distillée, et les alcaloïdes sont recherchés à l'aide du réactif de BOUCHARDAT, dans l'eau acidulée de rinçage et dans l'eau du cristalliseur, après neutralisation ; le résultat est alors négatif.

D'après cet auteur, « la plante profiterait de la période de germination de ses graines, au cours de laquelle il se produit une sorte de ramollissement des tissus, pour les expulser dans l'eau (ou la terre), sinon entièrement, du moins en partie ».

L'insuccès de la deuxième série d'expériences peut être aussi dû à l'emploi du réactif de BOUCHARDAT, qui n'est pas assez sensible sur une faible quantité d'alcaloïdes dissous dans une grande quantité de liquide acidulé ; l'emploi de la solution d'acide silico-tungstique aurait peut-être donné un résultat positif.

Les essais que nous avons nous-même entrepris sur les plantules de graines de Tabac (Cf. p. 61) ne nous ont pas permis de mettre en évidence une sortie d'alcaloïdes par les racines ; l'examen microscopique des racines sorties par les trous pratiqués à la base des pots où se trouvaient des semis ne nous ont pas permis de constater l'exsudation, comme nous l'avons fait dans les parties aériennes de la plante.

En résumé, il n'y a perte *prouvée* d'alcaloïdes dans l'eau de germination qu'avec des graines stériles ou avec les graines *avant* la germination.

b. — LA PERTE D'ALCALOÏDES SE PRODUIT-ELLE PAR UNE ÉVAPORATION D'AZOTE ?

C'est du moins l'hypothèse qu'ont émise certains phytochimistes partisans de l'alcaloïde « substance de déchet ». Avant d'examiner leurs résultats, nous allons rechercher s'il est possible que l'élimination de ce gaz par la plante ait lieu chez les végétaux non alcaloïfères. Plusieurs auteurs se sont occupés de cette question et l'ont résolue par l'affirmative.

1^o DEHÉRAIN et LANDRIN (1874) faisant germer des grains

de Blé, de Cresson ou d'Orge, constatent une diminution d'azote qui disparaît à l'état libre ; pour ces auteurs, l'azote existerait sous forme gazeuse libre à l'intérieur de la graine.

2^o LECLERC (1875) reprend des analyses analogues à celles des auteurs précédents; il prouve que l'azote dégagé n'existe pas à l'état libre dans la graine, mais provient de la désagrégation des matériaux de réserve protéique.

3^o BOUSSINGAULT (1881) dose comparativement l'azote : dans les graines de Maïs, dans la plante adulte, dans le sol sous forme d'azote ammoniacal et d'azote nitrique, et constate que la plante de Maïs a perdu 0^{gr},177 d'azote sous forme gazeuse.

4^o LUTZ (1905) fait germer des graines de Maïs, de Courge, etc., sur des milieux synthétiques rigoureusement aseptisés; ces milieux sont ensuite additionnés de sels d'alcaloïdes ou de sels organiques. L'auteur rejette toutes les cultures dans lesquelles s'est produite une fermentation dans le sol de culture ; il dose enfin l'azote sous ses diverses formes et affirme qu'il s'est produit une perte d'azote sous forme gazeuse qui, dans le cas des plantes ayant poussé dans les milieux additionnés des sels alcaloïdaux varie de 13,68 p. 100 à 43,04 p. 100 de l'azote contenu dans la graine. Lutz reprend des expériences identiques en faisant germer des plantes sur de l'eau distillée sans aucune addition de sels alcaloïdaux ; les résultats sont semblables à ceux des germinations précédentes.

D'après cet auteur, la rapidité de destruction varie suivant les plantes et suivant leur état de développement ; tant que la graine germe, il n'y a aucune perte d'azote ; c'est après que ce stade est dépassé que l'azote disparaît, même en l'absence de microorganismes. Cette désassimilation serait due à un phénomène comparable, jusqu'à un certain point, à une auto-fermentation et serait un des prodromes de la mort du végétal.

Il aurait été intéressant de connaître par des expériences précises comment se comportent des plantes productrices d'alcaloïdes ; malheureusement, il n'existe aucun fait expérimental pour prouver cette perte, mais seulement des affir-

mations ; ce sont celles de CLAUTRIAU qui, dans ses essais de dosage comparatif d'azote alcaloïdal, d'azote albuminoïde et de l'azote des nitrates dans la capsule de pavot, constate qu'il y a une perte de ce gaz dans les trois formes précédentes, et l'auteur en conclut : « Cet azote doit évidemment se dégager dans l'atmosphère, mais sous quelle forme ? Ce point reste à résoudre. »

RIPPERT, résumant le résultat de ses recherches sur le cycle évolutif des alcaloïdes de la Belladone, écrit : « Ils (les alcaloïdes) semblent être éliminés à l'état gazeux et représentent une perte d'azote pour la plante. »

En résumé, la perte d'azote n'est pas spécifique des plantes alcaloigènes et n'a pas même pu être prouvée pour celles-ci ; aussi GORIS était-il fondé d'écrire en 1914 en traitant du rôle des alcaloïdes : « Il y a là un point intéressant qui devra être élucidé par ceux qui voudront reprendre cette question du rôle des alcaloïdes. Pour nous, elle est l'expérience primordiale par où devra être abordée la question. »

c. — LA PERTE D'ALCALOÏDES SE PRODUIT-ELLE SOUS FORME DE NH^3 ÉLIMINÉ PAR LA PLANTE ?

La constatation d'une perte de NH^3 par les plantes est récente ; elle est due à G. KLEIN et STEINER (1928), ces auteurs ayant étudié 78 Dicotylédones, 21 Monocotylédones, 4 Champignons, affirment qu'il s'échappe de la plupart de ces végétaux : NH^3 gazeux qui ne peut pas être fixé chimiquement, et qui est perdu par la plante ; cette ammoniacque provient de la désagrégation des albumines. Chez les feuilles, l'âge est le facteur déterminant de cette perte ; les plus jeunes sont les plus actives, mais toutes dégagent de l'ammoniacque ; cette perte augmente avec la température.

Ces résultats nouveaux paraissent provoquer en 1929 une expérience de WEEWERS sur la plante d'*Ilex paraguayensis* (Maté) pour savoir si à la diminution d'alcaloïdes correspondrait une disparition de NH^3 .

L'expérience de ce savant consiste à mettre sous une cloche à tubulure la partie supérieure de la plante ; le renouvellement

d'air est assuré par une trompe à eau; à son entrée, l'air est débarrassé de NH_3 atmosphérique par passage dans une solution diluée de SO_4H_2 ; à sa sortie, il traverse un premier flacon contenant de l'eau et un deuxième flacon dans lequel est disposé HCl dilué (l'expérience dure sept jours). La quantité d'ammoniaque ainsi recueillie est extrêmement faible et peut être considérée comme négligeable.

A. GUILLAUME procède à une expérience semblable sur les plantes de *Lupinus variabilis* (expériences à la lumière et à l'obscurité); l'auteur se propose de recueillir dans des flacons laveurs contenant un liquide acide soit l'alcaloïde volatil, soit l'ammoniaque qui aurait pu se dégager.

a. A l'obscurité, il constate une absence d'alcaloïde et d'ammoniaque; les dosages comparatifs de l'azote protéique et de l'azote alcaloïdal montrent qu'il y a eu augmentation d'alcaloïdes aux dépens des protéines.

b. A la lumière: le résultat est encore négatif en ce qui concerne l'alcaloïde, mais positif pour l'ammoniaque; le dégagement de ce corps chimique a lieu en très petite quantité, mais n'est pas négligeable.

Pour l'auteur, il y aurait, au début de la germination à la lumière, un passage de l'alcaloïde dans l'eau de germination (Voir expériences déjà citées), suivi d'une décomposition sous l'action des rayons solaires, avec production de petites quantités d'ammoniaque.

En résumé, les faibles pertes d'ammoniaque constatées dans des cultures de plantes alcaloïgènes ne peuvent pas être attribuées à coup sûr à une perte d'alcaloïdes; d'autre part, ce dégagement n'est pas spécifique, puisque les plantes sans principe actif sont le siège d'un dégagement encore plus intense.

d. — LA PERTE D'ALCALOÏDES PEUT-ELLE ÊTRE EXPLIQUÉE PAR UNE EXCRÉTION SUIVIE D'UNE VOLATILISATION DU PRINCIPE ACTIF ?

Puisque la perte d'alcaloïdes n'a pu être rapportée sûrement ni à une évaporation d'azote libre, ni à une évaporation de NH_3 , il faut se demander s'il n'y aurait pas lieu d'envisager

une émission directe d'alcaloïde à l'extérieur de l'organisme.

Nous avons vu que les expériences de GUILLAUME ne permettent pas de mettre en évidence la volatilisation d'alcaloïde par le Lupin, mais cet insuccès peut être dû à des imperfections de la technique opératoire. D'autre part, il ne nous est pas possible d'affirmer qu'un résultat négatif, même correct en ce qui concerne les alcaloïdes du Lupin, le soit aussi pour d'autres alcaloïdes.

La seule indication que l'on possède antérieurement à nos recherches sur une telle perte d'alcaloïdes par la plante est celle que donne TUNMANN dans son étude des alcaloïdes de *Strychnox Nux-Vomica*. Comme nous l'avons déjà fait connaître, cet auteur, voulant expliquer la perte de principe actif, suppose qu'une partie de l'alcaloïde est rejetée dans le sol par les racines et passe dans l'eau de germination. D'autre part, il constate que les cotylédons et les premières feuilles de l'axe épicotylé sont recouverts d'une substance mucilagineuse d'une amertume extrême, mucilage qui doit probablement contenir des alcaloïdes.

Nos recherches semblent, pour la première fois, apporter la solution au problème de la disparition des alcaloïdes chez le Tabac, sous forme d'une exsudation, puis d'une volatilisation du principe actif à la face externe de la plante, la production de ce phénomène étant liée à l'existence des conditions extrinsèques et intrinsèques que nous avons déjà indiquées.

Dans nos examens histochimiques, nous avons mis en évidence la formation de nombreuses gouttelettes d'exsudation sans avoir pu mesurer quantitativement cette perte d'alcaloïdes; mais il est bien permis de l'apprécier, d'une façon subjective sans doute, et de dire qu'à elle seule elle est suffisante pour expliquer les diminutions très sensibles du taux alcaloïdal dans les plantes, à la fin de leur végétation, puisqu'elle est maximum dans les feuilles mûres.

Les conditions extrinsèques que nous avons mises en évidence d'une façon approximative mériteraient d'être contrôlées par des dosages chimiques, c'est-à-dire en faisant germer et se développer des plantes de Tabac dans une atmo-

sphère saturée d'humidité et dans une atmosphère chaude et sèche. Le dosage comparatif qui pourrait alors être fait indiquerait la perte d'alcaloïdes dans les deux cas et permettrait de se rendre compte si un air chaud et sec est indispensable à la production du phénomène, ou quelle est son influence exacte. Ce serait là un point intéressant à élucider, et l'on pourrait ainsi établir une analogie avec l'émission de NH^3 qui augmente avec la température.

Nos expériences physiologiques paraissent avoir apporté une preuve cruciale à l'émission de nicotine par la plante de Tabac, puisque le Blé (plante non alcaloïgène), placé dans des conditions identiques, n'a donné aucune réaction avec la solution d'acide silico-tungstique ; mais on peut toutefois leur faire le reproche qu'elles n'ont pas permis le dosage de l'alcaloïde rejeté et précipité dans la solution d'acide silico-tungstique et nous obligent à apprécier cette quantité d'une façon fort subjective par nos seuls examens histochimiques. Cette lacune provient, ainsi que nous l'avons exposé, de la grande difficulté de recouvrir d'une cloche une plante à maturité ; en supposant que cette expérience fût possible, la nécessité de faire disparaître des parois de la cloche toute l'eau d'évaporation, pour réaliser une atmosphère sèche (indispensable dans l'état actuel de nos connaissances à la production du phénomène) conduirait à un chauffage extrêmement intense des parois et de l'air intérieur, température à laquelle la plante ne saurait probablement pas résister. D'autre part, quelle que soit la rapidité du renouvellement d'air compatible avec la bonne marche de l'appareil, les plantes mises sous la cloche ne tardent pas à s'étioler, et l'expérience ne peut guère être poursuivie au delà de soixante-douze heures.

L'ensemble de ces recherches nous conduit forcément à considérer les alcaloïdes du Tabac comme des déchets du métabolisme cellulaire, puisque, sous certaines conditions, la base végétale est rejetée hors de la plante qui l'a produite et non comme une substance de réserve, puisque aucun examen n'a pu prouver son utilisation.

D'après un récent ouvrage de COMBES que nous citons : « Les vieilles expressions d'alcaloïde « substance de réserve »,

d'alcaloïde « substance de déchet », expressions qui sont encore en usage courant en biochimie végétale, et portent l'empreinte finaliste, devraient être abandonnées, parce qu'elles donnent aux corps auxquelles on les applique une idée fausse au point de vue biologique. »

Nous sommes entièrement de l'avis de COMBES; il est bien entendu qu'en employant le terme de déchet nous ne lui attachons pas une idée finaliste. Nous ne voulons pas écrire que l'alcaloïde a été créé dans le but d'être rejeté, mais, puisqu'il faut appeler chaque chose par un nom, comment qualifier un produit ou tout au moins la portion de ce corps qui est excrétée et volatilisée ?

Peut-être, nous dira-t-on, la molécule alcaloïdale sera-t-elle utilisée ultérieurement par la plante, ou peut-être l'est-elle en même temps qu'une partie est rejetée, comme le sont, suivant les travaux de CHARABOT, LALOU et HÉBERT, les huiles essentielles. C'est possible, mais rien ne le prouve... et, lorsque seulement cette preuve sera établie, l'on pourra considérer la nicotine du Tabac comme un « déchet occasionnel », tout comme l'asparagine est considérée comme un « aliment conditionnel ».

Enfin il paraît intéressant de souligner que la volatilisation d'un alcaloïde constitue le troisième type des phénomènes de ce genre, jusqu'à présent observés chez les Végétaux ; les essences paraissent, en effet, lorsqu'elles ne sont pas enkystées dans des cavités à l'intérieur de la plante, être volatilisées au dehors. D'autre part, depuis les observations de P. DANGEARD, on sait que beaucoup d'Algues marines volatilisent de l'iode libre dans le milieu extérieur ; nous ne saurions, bien entendu, préciser la signification biologique de ces rapprochements, mais il semble intéressant de faire ressortir ainsi l'importance et la diversité des phénomènes de volatilisation chez les Végétaux.

Y a-t-il lieu de généraliser nos résultats à toutes les plantes alcaloïfères ?

Nous ne le croyons certainement pas, car, sous le nom d'alcaloïdes, on a classé un grand nombre de corps n'ayant de commun que leurs propriétés basiques plus ou moins accen-

tuées. Mais des différences importantes et notables existent entre les alcaloïdes; on sait que certaines réactions chimiques, qui sont spécifiques d'un groupe d'alcaloïdes, ne le sont pas à un autre. Leur basicité même est extrêmement variable; alors que la nicotine est très basique, la caféine est presque neutre. Certains alcaloïdes comme la nicotine, la spartéine, la conicine sont liquides et volatils; d'autres, qui contiennent de l'oxygène, sont solides et non volatils.

Une telle variété de propriétés physiques et chimiques, que nous ne faisons que schématiser, ne doit-elle pas correspondre à un comportement différent de ces corps à l'intérieur de la plante qui les élabore?

Nous croyons que l'on a eu grand tort, dans la plupart des travaux sur les alcaloïdes, de traiter leur « histoire biologique » en généralisant les résultats obtenus; il serait de beaucoup préférable d'étudier le rôle d'un alcaloïde déterminé dans une plante déterminée, et non le rôle des alcaloïdes dans toutes les plantes alcaloïgènes. L'on éviterait ainsi beaucoup de discussions stériles, et nos connaissances pourraient s'enrichir de faits précis, basés sur une expérimentation rigoureuse. Alors seulement une synthèse générale serait possible, et l'on ne pourrait plus écrire, comme le faisait PFEFFER en 1881: « Quant à la signification des alcaloïdes dans les échanges nutritifs des plantes, l'on ne peut absolument rien dire. »

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Notre étude biologique des alcaloïdes du Tabac a été conduite suivant les techniques et les données modernes de la Cytologie et de l'Histochimie, et nos résultats ont pu être contrôlés par des expériences physiologiques. Elle a permis :

1° De confirmer que le réactif le plus approprié à la recherche microchimique des alcaloïdes du Tabac était le réactif de BOUCHARDAT, sous les réserves déjà énumérées.

2° De confirmer que la graine de Tabac est dépourvue d'alcaloïdes dans ses parties actives et d'expliquer la présence éventuelle de la base végétale à l'extérieur du tégument.

3° Nos observations sur la localisation de la nicotine sont parmi les plus complètes qui aient été faites sur les plantes alcaloïgènes, puisque nous avons établi le cycle de l'alcaloïde depuis la graine jusqu'à la formation du fruit.

4° Nos essais de localisation sur les plantules ont prouvé que la nicotine apparaissait dans toute cellule en voie de division ou de prolifération, que l'alcaloïde existait dans tous les éléments vivants, sauf dans les vaisseaux et les tubes criblés en fonction.

5° Dans les plantes adultes, l'alcaloïde émigre dans les parties périphériques, tout en continuant à se former dans le parenchyme libérien, qui paraît être le siège d'une élaboration très intense.

6° La teneur alcaloïdale diminue dans les plantules étiolées par pénurie de matériaux nutritifs et dans les plantes adultes après la fécondation.

7° Nous avons établi une comparaison entre la localisation des alcaloïdes dans le Tabac et dans d'autres plantes alcaloïfères.

8° Nos recherches ont permis de préciser le lieu de formation de la nicotine dans la cellule; elles ont prouvé d'une manière irréfutable que la nicotine se formait toujours à l'intérieur des vacuoles, dès le début de l'apparition de celles-ci : dans la graine par suite de la fonte du grain d'aleurone, dans les méristèmes à l'intérieur des vacuoles mitochondriiformes; que cette localisation était constante aux différentes phases de l'évolution des vacuoles, et identique dans tous les méristèmes.

9° Dans l'état actuel de nos connaissances, les techniques cytologiques de fixation et de coloration ne permettent pas de conserver la nicotine à l'intérieur de la cellule.

10° Nos recherches histochimiques faites dans la graine ont démontré, pour la première fois, l'apparition de l'alcaloïde au sein même des grains d'aleurone, de nature protéique et en voie de liquéfaction : argument nouveau pour établir l'origine des alcaloïdes aux dépens des matières albuminoïdes, ce fait n'étant sans doute qu'un cas particulier d'un phénomène général.

11° L'étude histochimique des épidermes a prouvé l'apparition, à la face externe de la plante, de gouttelettes d'un exsudat, en relation avec la teneur alcaloïdale des cellules où elles se forment. La présence et l'intensité de ce phénomène varient suivant des conditions intrinsèques (cellules et organes examinés, état du développement) et des conditions extrinsèques (température, nature du sol, conditions culturales, heures de la journée, etc.); le rôle de ces dernières n'a pas pu être précisé d'une façon absolue.

12° La preuve que les exsudats mis en évidence sont constitués par l'alcaloïde produit par la plante est apportée :

a. Par des arguments histochimiques, permettant une série de déductions;

b. Par des expériences physiologiques prouvant que le Tabac émet dans l'atmosphère des produits donnant avec l'acide silico-tungstique les réactions spécifiques des alcaloïdes (formation de trouble et de cristaux identiques).

13° L'expérience sur le Blé démontre que les réactions

obtenues ne sont pas présentées par une autre plante non alcaloïgène.

14° La perte d'alcaloïde chez les plantes ne pouvant être attribuée ni à une perte d'alcaloïde par les racines, ni à une perte d'azote ou de NH_3 non spécifiques des plantes alcaloïgènes, ni à une utilisation par la plante (exception faite pour les plantes à caféine : expériences de WEEWERS), seule l'émission directe d'alcaloïde par les faces externes suivie d'une volatilisation du produit permet d'expliquer cette disparition. Nos expériences et nos examens ont été les premiers effectués dans cette voie.

15° La partie de l'alcaloïde excrété et volatilisé doit être considérée comme un déchet du métabolisme cellulaire.

16° Il n'est pas certain que l'on puisse généraliser le cas du Tabac à toutes les plantes alcaloïgènes.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- ALBO (G.). — Il significato fisiologico della Nicotina nelle piante di tabacco (*Biol. vég.*, Palerme, 1901).
- Alcune considerazioni sul significato fisiologico degli alcaloidi vegetali (*Nuovo giornale bot. ital.*, V, 9, 1902).
- Sui principi alcaloidici dei semi di tabacco (*Bull. Soc. bot. ital.*, Firenze 1902).
- AUBEL, AUBERTIN et GENEVOIS. — Sur le potentiel d'oxydo-réduction de la levure, des anaérobies facultatifs, des anaérobies stricts et des milieux où vivent les organismes (*Ann. de physiol. et de physico-chimie biol.*, n° 1, 5, 1929).
- BEAUSITE (F.). — Étude de la teneur alcaloïdique de la Belladone cultivée (Thèse Doc. Un. Pharm., Paris, 1919).
- BERTRAND (G.). — Sur l'emploi de l'acide silico-tungstique comme réactif des alcaloïdes (*Bull. Soc. chimie*, 3^e série, XXI, 434, 1899).
- BERTRAND et JAVILLIER. — Emploi de l'acide silico-tungstique (*Bull. Soc. chim.*, 4^e série, 241, 1909).
- BLOT. — Recherche des meilleures conditions pour les porte-graines (*Mémorial des Tabacs*, 1884).
- BØDEKER. — Chemische physiologischen Untersuchungen einiger Stoffe aus der Menispermee (*An. Chem. Pharm.*, LXIX, 37, 1849).
- BORSCHOW. — Beiträge zur Histochemie der Pflanzen (*Bot. Zeit.*, XXXII, 38, 1874).
- BOUCHARDAT. — De l'action qu'exercent sur les végétaux les produits organiques ou inorganiques qui sont des poisons pour les animaux (*C. R. Ac. sc.*, XVII, 112, 1843).
- BOUSSINGAULT. — Sur la dissociation de l'acide des nitrates pendant la végétation obtenue à l'obscurité (*Anal. ch. phys.*, 3^e série, XXII, 433, 1881).
- CAPUS (G.), LEULLIOT (F.) et FOEX (Et.). — Le Tabac (3 vol. Soc. d'éditions géographiques, maritimes et coloniales, Paris, 1929-1930).
- CHARABOT. — Le parfum chez la fleur (Doin, Encyclopédie Scientifique, Paris, 1908).
- CHAZE (J.). — Sur l'apparition et la localisation de la nicotine dans la plantule de Tabac (*C. R. Ac. sc.*, CLXXXV, 80, 1927).
- Sur le mode de formation et la détection des alcaloïdes dans la plantule de Tabac (*Bull. hist. appliquée*, V, juin 1928).
- Sur la localisation et la disparition des alcaloïdes dans l'épiderme de la feuille de Tabac (*C. R. Ac. sc.*, CLXXXVII, 837, 1928).

- CHAZE (J.). — Contribution aux études cytologique, microchimique et micrographique de la plante de Tabac (*Mémorial des manufactures de l'État*, 1930).
- Preuves expérimentales de l'excrétion de la nicotine dans les parties aériennes de la plante de Tabac (*C. R. Ac. sc.*, CXCII, 1268, 1931).
- CHEVALIER (J.). — Variation de la teneur en spartéine du Genêt à balais suivant l'époque de la végétation (*C. R. Ac. sc.*, CLV, 293, 1912).
- Influence de la culture sur la teneur en alcaloïdes de quelques Solanées (*C. R. Ac. sc.*, CL, 344, 1910).
- CHUARD et MELLET. — Variation de la proportion de nicotine dans les divers organes de la plante de Tabac au cours de la végétation (*C. R. Ac. sc.*, CLV, 293, 1912).
- Sur la production de la nicotine dans la plante de Tabac (*Arch. Sc. phy. nat.*, XXXVII, 283).
- CIAMICIAN (G.) et RAVENNA (C.). — Recherches sur la genèse des alcaloïdes dans les plantes (*Ann. de chim. et phys.*, XXV, 404, 1912).
- Sur la signification biologique des alcaloïdes dans les plantes (*C. R. Ac. sc.*, CLXXI, 836, 1920).
- Sur la signification biologique des alcaloïdes dans les plantes ; traduit librement par R. CERIGHELLI (*Bull. Soc. chim. biol.*, V, 59, 1923).
- CLAUTRIAU (G.). — L'azote dans les capsules de Pavot (*Recueil Inst. bot. Errera*, II, 253, 1906).
- Localisation et signification des alcaloïdes dans quelques graines (*Recueil Inst. bot. Errera*, II, 265-280, 1906).
- Nature et signification des alcaloïdes des végétaux (*Recueil Inst. bot. Errera*, V, 1-87, 1902).
- Recherches microchimiques sur la localisation des alcaloïdes dans le *Papaver somniferum* (*Recueil Inst. bot. Errera*, II, 237-251, 1906).
- COMBES (R.). — La vie de la cellule végétale ; les enclaves de la matière vivante (Paris, 1929).
- CORNEVIN (CH.). — Action des poisons sur la germination des graines des végétaux dont ils proviennent (*C. R. Ac. sc.*, CXIII, 274, 1891).
- CUTLER, THERON, OOSTHUIZEN. — Tobacco cultivation for nicotine (*Journ. Dep. agric. S. africa*, IX, 451, 1924).
- DANGEARD (P.-A.). — Sur la nature du chondriome et son rôle dans la cellule (*C. R. Ac. sc.*, CLXXXVI, 439, 1918).
- DANGEARD (P.). — Contribution à la connaissance du cycle de l'iode chez les Algues marines (*Le Botaniste*, 20^e série, LXIX, 115, 1928).
- DEHERAIN et LANDRIN. — Recherches sur la germination (*C. R. Ac. sc.*, LXXVIII, 1488, 1874).
- DE DROOG (EM.). — Contribution à l'étude de la localisation microchimique des alcaloïdes dans la famille des Orchidacées (*Recueil Inst. bot. Errera*, II, 347-373, 1906).
- DUNSTAN. — *Pharm. Journ. and Trans.*, XVIII, 716, 1887.
- EICHHORN (A.). — Action des colorants vitaux sur la croissance des racines (*C. R. Soc. biol.*, CIII, 374, 1930).
- ERRERA (L.). — Un ordre de recherches trop négligé. L'efficacité des structures défensives des plantes (*Recueil Inst. bot. Errera*, I, 209-311, 1908).
- Sur la distinction microchimique des alcaloïdes et des matières protéiques (*Recueil Inst. bot. Errera*, II, 189-227, 1906).

- ERRERA (L.), MAISTRIAU et CLAUTRIAU (G.). — Premières recherches sur la localisation et la signification des alcaloïdes dans les plantes (*Recueil Inst. bot. Errera*, II, 147-183, 1906).
- FELDHAUS. — Quantitative Untersuchungen über Verteilungen des Alkaloides in den Organen von *Datura Stramonium* (Dissert. Marburg, 34 p., 1903).
- FILIP (P.). — De la perte de nicotine des Tabacs en feuilles par le fait de la fermentation en masses (*Mémorial des Tabacs*, IV, 205).
- GAUCHER (L.). — De la caféine et de l'acide cafétanique dans le Caféier. Recherches microchimiques (Thèse Pharm. Montpellier, 1895).
- GUÉRIN (P.). — Recherches sur la localisation de l'Anagyrine et de la Cytisine (Thèse Pharm. Paris, 1895).
- GUILLAUME (A.). — Contribution à l'étude biologique des alcaloïdes : Recherches expérimentales sur le Lupin (Thèse doct. Sc. Nat. Paris, 1930).
- GUILLIERMOND (A.). — État actuel de la question de l'évolution et du rôle physiologique des mitochondries, d'après les travaux récents de la cytologie végétale (*Revue gén. Bot.*, XXVI, 129-182, 1914).
- Nouvelles observations vitales sur le chondriome des cellules épidermiques de la fleur d'*Iris germanica*. — I. Élaboration d'amidon et de xanthophylle au sein des chondriocontes (*C. R. Soc. biol.*, LXXVIII, 241, 1915).
- II. Production de globules graisseux au sein des mitochondries et des plastes. Fixation du chondriome (*C. R. Soc. biol.*, LXXVIII, 1915).
- Sur l'origine des vacuoles dans les cellules de quelques racines (*C. R. Soc. biol.*, LXXXIII, 411, 1920).
- Origine et évolution du système vacuolaire des cellules végétales et grains d'aleurone (*C. R. Soc. biol.*, LXXXV, 1033, 1922).
- Le vacuome de la cellule végétale (*Bull. hist. appl.*, II, 18, 1925).
- Nouvelles observations sur la coloration vitale par le rouge neutre dans les cellules végétales (*C. R. Ac. sc.*, CLXXXVIII, 813, 1929).
- Culture d'un *Saprolegnia* en milieux nutritifs additionnés de rouge neutre. Valeur de la méthode de coloration vitale (*Bull. Hist. appl.*, VII, 1930).
- Sur la toxicité des colorants vitaux (*C. R. Soc. biol.*, LIV, 468, 1930).
- Le vacuome des cellules végétales (*Protoplasma*, IX, 1930).
- GUILLIERMOND (A.) et MANGENOT (G.). — Revue des travaux de cytologie parus de 1910 à 1925 (*Revue générale Bot.*, 230 p., 1926).
- GUILLIERMOND, DUFRENOY et LABROUSSE. — Germination des graines de Tabac dans des milieux additionnés de rouge neutre. La coloration du vacuome pendant le développement des plantules (*C. R. Ac. sc.*, CXC, 1439, 1930).
- GORIS (A.). — Localisation et rôle des alcaloïdes et des glucosides chez les végétaux (Paris, 1914).
- HECKEL (Ed.). — Sur l'utilisation et la transformation de quelques alcaloïdes dans la graine pendant la germination (*C. R. Ac. sc.*, CX, 88, 1890).
- HERDER. — Ueber einige neue allgemeine Alkaloidreagentien und deren mikrochemischen Verwendung (*Arch. Pharm.*, CCXLIV, 132, 1906).
- ILIYN (G. S.). — La formation de la nicotine pendant la germination des graines de Tabac (Public. de l'Inst. du Tabac à Krasnodar, LVII, 24 p., 1929).
- Sur le métabolisme de la nicotine chez le Tabac (Public. de l'Inst. du Tabac à Krasnodar, LXIX, 1930) (en russe, résumé en anglais).

- JACQUEMIN (A.). — Sur la localisation des alcaloïdes dans les Légumineuses (*Recueil Inst. bot. Errera*, VI, 257, 1906).
- KELLNER (O.), MAKINO (K.), OGASAWARA (K.). — Die Zusammensetzung, der Theablätter in verschiedenen Vegetationstadien (*Die Land. Versuchs.* XXXIII, 370, 1887).
- KLEIN (G.) et HERNDLHOFFER (E.). — Der mikrochesmische Nachweis der Alkaloïde in der Pflanze (*Österreich bot. Zeit.*, LXXXVI, 222, 1927).
- KLEIN (G.) et STEINER. — Stickstoffbasen in Elweistaban höherer Pflanzen I Ammoniak und flüchtige Amine (*Jahrb. Wiss. Bot.*, LXVIII, 602-710, 1928).
- LECLERC. — Sur la germination de l'Orge Chevalier (*C. R. Ac. sc.*, LXXX, 28, 1875).
- LINDT. — Ueber den mikrochemischen Nachweis von Brucin und Strychnin (*Zeitschr. für Wiss. mikrosk.*, I, 237, 1884).
- LUTZ. — Localisation des principes actifs dans les Seneçons (*Bull. Soc. Bot.*, XLII, 486, 1895).
- Recherches sur la nutrition des végétaux (*Ann. Sc. Nat., Bot.*, 8^e série, p. 1-105, 1899).
- Sur l'emploi des substances organiques comme source d'azote pour les végétaux vasculaires et cellulaires (*Bull. Soc. bot.*, 4^e série, 5-201, 1905).
- MACAIRE-PRINCEPS. — Note sur l'empoisonnement des végétaux par les substances vénéneuses qu'ils fournissent eux-mêmes (*Ann. Ch. Phys.*, XXXIX, 95, 1828).
- MANGENOT (G.). — Données morphologiques sur la matière vivante (Librairie Guillon, Paris, 1930).
- Sur la signification des cristaux rouges apparaissant sous l'influence du bleu de crésyl dans les cellules de certaines Algues (*C. R. Ac. sc.*, CLXXXVI, 57, 1928).
- Sur la localisation des iodures dans les cellules des Algues (*Bull. Soc. bot.*, 5^e série, IV, 519-538).
- MARACCI. — L'azione degli alcaloidi nel regno vegetale e animale (*An. chim. Farm. Milano*, V, 3, 1887).
- MARCEY. — De l'action des poisons sur le règne végétal (*Ann. Chim. Phys.*, 2^e série, XXIX, 200-224, 1825).
- MIRANDE (M.). — Recherches physiologiques et anatomiques sur les Cuscutacées (Thèse Doct. Sc., 1900).
- MOLISCH (H.). — Grundriss einer Histochemie der pflanzlichen Genussmittel (Iéna, 1891).
- MOLLE (PH.). — Recherches de microchimie comparée sur la localisation des alcaloïdes dans les Solanacées (*Recueil Inst. Bot. Errera*, VI, 57-71, 1906).
- Mosso (U.). — Azioni di alcuni alcaloidi sul germogliamento dei Semi e sul successivo sviluppo della piante (*Att. d. Soc. Ligustica di Scienze not. e geogr. Genova*, V, 1-8, 1894).
- MOTHES (K.). — Pflanzen physiologische Untersuchungen ueber die Alkaloïde : das Nikotin in Stoffwechsel der Tabakpflanze (*Planta*, V, 563, 1928).
- Das Nikotin im Stoffwechsel der Tabakpflanze (*Apoteker Zeit.*, n° 13, 193).
- NAGEOTTE. — Organisation de la matière dans ses rapports avec la vie (F. Alcan, Paris, 1922).

- OOSTHUIZEN (J. DU P.). — Tobacco cultivation for nicotin (*Journal of the Department agr.*, II, 166-175, 1923).
- PARAT (M.). — Contribution à l'étude morphologique et physiologique du cytoplasme (*Arch. d'anatomie micr.*, XXIV, 74-357, 1928).
- PARIS (G.). — Études et recherches sur la biochimie du tabac (Extrait des *Botanical Abstracts Stoz. sper. agron. ital.*, 53, 1920).
- PERREAU et FOUQUET. — Recherches de la nicotine dans les diverses parties de la plante de Tabac (*Mémorial des Tabacs*, 465, 1906).
- PFEFFER. — Ueber Aufnahme von Anilinfarben in lebenden Zellen (*Untersuch. aus. d. Botan. Institut zu Tübingen*, 1886).
- PICTET. — Quelques considérations sur la genèse des alcaloïdes dans les plantes (*Arch. Sc. phys. et nat. Genève*, XIX, 329-352).
- REVEIL (P.-O.). — De l'action des poisons sur les plantes (Thèse Doct. Lyon, 1865).
- RIPERT (J.). — Sur la variation et le rôle des alcaloïdes de la Belladone (Thèse Doct. Sciences Paris, 1922).
- ROSSOL. — Beiträge zur Histochemie der Pflanzen (*Sitzgsb. Ak. Wiss. Wien.*, I, 137, 1884).
- SAUVAN (L.). — Recherches sur la localisation de la brucine et de la strychnine dans les semences de *Strychnos-Nux-Vomica* (*Journ. Pharm. Chim.*, 6^e série, I, 496, 1895).
- SCHIMPER. — Anleitung zur mikroskopischen Untersuchung der Nahrungs (Genussmittel, Iena, 1886).
- SCHLÆSING fils (Th.). — Sur la production de la nicotine par la culture du Tabac (*C. R. Ac. sc.*, CLI, 28, 1910).
- SKUPIENSKI. — Acta Societatis Botanicorum Poliniæ, 1929.
- SOUÈGES (R.). — Recherches sur l'embryogénie des Solanacées (*Bull. Soc. bot.*, LXII, p. 163).
- STARKE (J.). — De la prétendue existence de la Solanine dans les graines de Tabac (*Bull. Ac. roy. de Belgique*, VII, 379, 1901).
- TARGIONI-TOZZETTI. — Animali e insetti del tabacco in erbo e del tabacco secco (Firenze, 1891).
- TONI (G.-B. DE) et MACH. — Sopra l'influenza esercitata della nicotina et della Solanina sulla germogliazione dei semi di Tabacco (*Boll. d. r. Ist. Un. Parmense*, 63, 1892).
- TUNMANN (O.). — Ueber die Alkaloide in *Strychnos-Nux vomica* (während der Keimung) (*Arch. d. Pharm.*, CCXLVIII, 644-657, 1910).
- TUNMANN (O.) et JENZER. — Pharmakognostische Untersuchungen über *Pilocarpus pennatifolius* und *Erythroxyton Coca* mit besonderer Berücksichtigung, ihrer Alkaloide (*Schweiz Woch. f. Chem. u. Pharm.*, XLVIII, 17-24, 1910).
- VANDERLINDEN (E.). — Recherches microchimiques sur la présence des alcaloïdes et des glucosides dans la famille des Renonculacées (*Recueil Inst. bot. Errera*, V, 135-178, 1902).
- VARIGNY (DE). — L'atropine est-elle un engrais végétal ? (*Rev. gén. bot.*, IV, 407-420, 1892).
- WEEWERS (Th.). — Die Funktion des Koffeins im Stoffwechsel von *Ilex paraguayensis* st. Hil. (*Proc. Koning ak. v. wet. Amst.*, XXXII, n° 3, 1929).
- Concerning the function of Coffein in the metabolism of *Paullinia cupana* (*Proc. Koning. Ak. V. Wet. t. Amst.*, XXIX, 1926).

- WEEWERS (TH.) et ORT (H. D. VAN). — Die Funktion der Alkaloïde in der Blättern von *Cinchona succirubra* Pavon (*Proc. Koning Ak. V. Wet. t. Amst.*, XXXII, n° 3, 1929).
- WILDEMANN (E. DE). — Présence et localisation d'un alcaloïde dans quelques Orchidées (*Revue Inst. bot. Errera*, II, 337, 1906).
- WINSTERTEIN et TRIER. — Die Alkaloïde (Berlin, 1910).

EXPLICATION DES PLANCHES

PLANCHE I

Fig. 1. — **Poil de la face inférieure de la feuille**, montrant les précipités de nicotine, abondants surtout dans la cellule basale. (Grossissement : 100 diamètres.)

Fig. 2. — **Poils de la face supérieure de la feuille**. — De gauche à droite :

1° Jeune poil, avec quelques précipités granuleux dans la cellule basale ; la cellule terminale est dépourvue de nicotine.

2° Poil plus âgé, ayant un aspect général semblable au précédent, mais avec accentuation de la réaction dans la cellule basale ; l'élément suivant montre le noyau, les chloroplastes, et à sa base quelques fins précipités alcaloïdaux.

3° Poil présentant le phénomène d'exsudation (sous forme de gouttelettes) bien marqué à la partie supérieure de la cellule basale, et plus faiblement dans la cellule suivante. (Grossissement : 100 diamètres.)

PLANCHE II

Fig. 3. — **Fragment de la cellule basale du poil** (face supérieure de la feuille) montrant :

1° A l'intérieur de la cellule :

- a. Les précipités granuleux de nicotine, dans les vacuoles ;
- b. La fusion de ces précipités en masses homogènes aux bords découpés ;
- c. Des grosses masses homogènes dans le cytoplasme pariétal.

2° A l'extérieur de la cellule :

La production du phénomène d'exsudation, sous forme de fines gouttelettes. (Grossissement : 300 diamètres.)

Fig. 4. — *A gauche* : Cristaux de silico-tungstate de nicotine, obtenus dans la première expérience (Cf. p. 78). — *A droite* : Cristaux obtenus dans la solution d'acide silico-tungstique, à la fin de la deuxième expérience (Cf. p. 79). (Grossissement : 300 diamètres.)



(Cliché P. GAVALLET.)

Fig. 1.



(Cliché P. GAVALLET.)

Fig. 2.

MASSON ET C^{ie}, Éditeurs.



(Cliché P. GAVALLET.)

Fig. 3.



(Cliché P. GAVALLET.)

Fig. 4.

MASSON ET C^{ie}, Éditeurs.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté.

1^o LES HORMONES ;

2^o LA GÉOLOGIE DE LA MONTAGNE DE CRUSSOL.

Vu et approuvé :

Paris, le 23 juin 1931,

Le Doyen de la Faculté des Sciences :

C. MAURAIN.

Vu et permis d'imprimer,

Le Recteur de l'Académie de Paris :

S. CHARLÉTY.

5533. 3-10-31. — CORBEIL. IMPRIMERIE. CRÉTÉ.
